(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2008-520193
(P2008-520193A)
(43)公表日　平成20年6月19日(2008.6.19)

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード（参考）
C12N	1/19	(2006.01)	C12N	1/19	ZNA	2B005
C12N	1/15	(2006.01)	C12N	1/15		2B150
C12N	1/21	(2006.01)	C12N	1/21		4B001
C12N	5/10	(2006.01)	C12N	5/00	A	4B018
C12P	7/64	(2006.01)	C12P	7/64		4B024

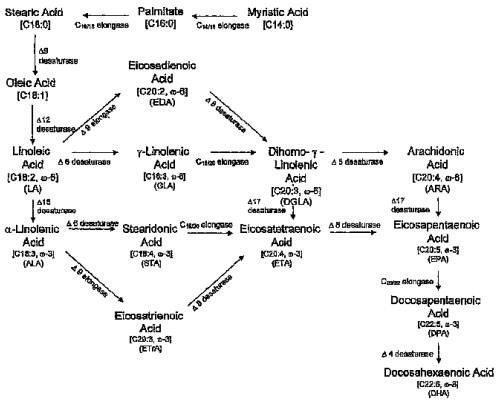
審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 206 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2007-540127 (P2007-540127)
(86)(22)出願日　平成17年11月3日 (2005.11.3)
(85)翻訳文提出日　平成19年6月29日 (2007.6.29)
(86)国際出願番号　PCT/US2005/040256
(87)国際公開番号　WO2006/052871
(87)国際公開日　平成18年5月18日 (2006.5.18)
(31)優先権主張番号　60/624,812
(32)優先日　平成16年11月4日 (2004.11.4)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　390023674
イー・アイ・デュポン・ドウ・ヌムール・アンド・カンパニー
E．I．DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY
アメリカ合衆国、デラウエア州、ウイルミントン、マーケット・ストリート　１００７
(74)代理人　110000741
特許業務法人小田島特許事務所
(74)代理人　100060782
弁理士　小田島　平吉
(72)発明者　ダムド，ハワード・ジー
アメリカ合衆国デラウエア州１９７０７ホツケシン・ケンウイクロード４
最終頁に続く

(54)【発明の名称】ドコサヘキサエン酸生成ヤロウィア・リポリティカ（YARROWIALIPOLYTICA）株

(57)【要約】
全油画分の５．６％を超えるドコサヘキサエン酸（ω－３多価不飽和脂肪酸であるＤＨＡ）を生成できる油性酵母ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）の組換え株について記述される。この株は、異種のデサチュラーゼ、エロンガーゼ、およびアシルトランスフェラーゼを発現する様々なキメラ遺伝子を含んでなり、場合により様々な天然デサチュラーゼおよびアシルトランスフェラーゼノックアウトを含んでなり、ＤＨＡの合成および高蓄積を可能にする。生産宿主細胞について特許請求され、前記宿主細胞内でＤＨＡを生成する方法についても特許請求される。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
ａ）Δ６デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、
ｂ）$C_{18/20}$エロンガーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、
ｃ）Δ５デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、
ｄ）Δ１７デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子
ｅ）$C_{20/22}$エロンガーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、および
ｆ）Δ４デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子。
のω－３／ω－６脂肪酸生合成経路遺伝子を含んでなる遺伝子プールを含んでなる、背景ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）種を含んでなるドコサヘキサエン酸生成のための組換え生産宿主細胞。
【請求項２】
ａ）Δ１５デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、
ｂ）Δ６デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、
ｃ）$C_{18/20}$エロンガーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、
ｄ）Δ５デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子
ｅ）$C_{20/22}$エロンガーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、および
ｆ）Δ４デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子。
のω－３／ω－６脂肪酸生合成経路遺伝子を含んでなる遺伝子プールを含んでなる、背景ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）種を含んでなるドコサヘキサエン酸生成のための組換え生産宿主細胞。
【請求項３】
ａ）Δ９エロンガーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、
ｂ）Δ８デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、
ｃ）Δ５デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、
ｄ）Δ１７デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子
ｅ）$C_{20/22}$エロンガーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、および
ｆ）Δ４デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子。
のω－３／ω－６脂肪酸生合成経路遺伝子を含んでなる遺伝子プールを含んでなる、背景ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）種を含んでなるドコサヘキサエン酸生成のための組換え生産宿主細胞。
【請求項４】
ａ）Δ１５デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、
ｂ）Δ９エロンガーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、
ｃ）Δ８デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、
ｄ）Δ５デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子
ｅ）$C_{20/22}$エロンガーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、および
ｆ）Δ４デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子。
のω－３／ω－６脂肪酸生合成経路遺伝子を含んでなる遺伝子プールを含んでなる、背景ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）種を含んでなるドコサヘキサエン酸生成のための組換え生産宿主細胞。
【請求項５】
遺伝子プールが、場合によりΔ１２デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子を含んでなる請求項１、２、３または４のいずれか一項に記載の組換え生産宿主。
【請求項６】
背景ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）種が、Δ１２デサチュラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするあらゆる天然遺伝子を欠いている請求項５に記載の組換え生産宿主。
【請求項７】
前記ω－３／ω－６脂肪酸生合成経路遺伝子の少なくとも１つが、配列番号２１０～２２１よりなる群から選択される核酸配列を有するプロモーター配列の制御下にある請求項

１、２、３または４のいずれか一項に記載の組換え生産宿主。
【請求項８】
前記Δ１２デサチュラーゼが、配列番号２９、３１、３３、３５、３６、３７、３９、４１、４３、４５、４６、４８～５０よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有する請求項５に記載の組換え生産宿主。
【請求項９】
前記Δ６デサチュラーゼが配列番号２および５よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、前記$C_{18/20}$エロンガーゼが配列番号２３および２６よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有する請求項１または２のどちらかに記載の組換え生産宿主細胞。
【請求項１０】
前記Δ９エロンガーゼが配列番号７０および２３よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、前記Δ８デサチュラーゼが配列番号７８、８０、および８２よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有する請求項３または４のどちらかに記載の組換え生産宿主細胞。
【請求項１１】
前記Δ５デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子が、酵素基質として、
ａ）リノレン酸およびジホモ－γ－リノレン酸、
ｂ）α－リノレン酸およびエイコサテトラエン酸、および
ｃ）リノレン酸、ジホモ－γ－リノレン酸、α－リノレン酸、およびエイコサテトラエン酸
よりなる群から選択される少なくとも２つの脂肪酸を結合する二機能Δ５／Δ６デサチュラーゼポリペプチドをコードする請求項１、２、３または４のいずれか一項に記載の組換え生産宿主。
【請求項１２】
前記二機能Δ５／Δ６デサチュラーゼポリペプチドが、配列番号１５および１８よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有する請求項１１に記載の組換え生産宿主。
【請求項１３】
前記Δ５デサチュラーゼが、配列番号７、９、１２、１５、および１８よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、前記$C_{20/22}$エロンガーゼが配列番号１０１および１０３よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、前記Δ４デサチュラーゼが配列番号１０５および１０７よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、請求項１、２、３、または４のいずれか一項に記載の組換え生産宿主細胞。
【請求項１４】
前記Δ１７デサチュラーゼが、配列番号２０に記載のアミノ酸配列を有する請求項１または３のどちらかに記載の組換え生産宿主細胞。
【請求項１５】
遺伝子プールが、場合によりΔ１５デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子を含んでなる請求項１または３のどちらかに記載の組換え生産宿主細胞。
【請求項１６】
前記Δ１５デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子が、酵素基質としてオレイン酸およびリノール酸の双方を結合する二機能Δ１５／Δ１２デサチュラーゼポリペプチドをコードする請求項２または４のいずれかに記載の組換え生産宿主。
【請求項１７】
前記二機能Δ１５／Δ１２デサチュラーゼポリペプチドが、配列番号５２に記載のアミノ酸配列を有する請求項１６に記載の組換え生産宿主。
【請求項１８】
前記Δ１５デサチュラーゼが、配列番号５２、５４、５４、５６、５８、６０、６２、および６４～６８よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有する請求項２または４のいずれかに記載の組換え生産宿主。
【請求項１９】

遺伝子プールが、場合により
ａ）Δ９デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、
ｂ）$C_{16/18}$エロンガーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、および
ｃ）$C_{14/16}$エロンガーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子
よりなる群から選択されるω－３／ω－６脂肪酸生合成経路遺伝子を含んでなる請求項１、２、３または４のいずれか一項に記載の組換え生産宿主。

【請求項２０】
前記$C_{16/18}$エロンガーゼが配列番号８４、８７、および９５よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、前記$C_{14/16}$エロンガーゼが配列番号９８に記載のアミノ酸配列を有する請求項１９に記載の組換え生産宿主。

【請求項２１】
遺伝子プールが、場合により
ａ）ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ（ＤＧＡＴ１）、
ｂ）ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ（ＤＧＡＴ２）、
ｃ）リン脂質：ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ（ＰＤＡＴ）、
ｄ）アシル－ＣｏＡ：１－アシルリゾホスファチジルコリンアシルトランスフェラーゼ（ＬＰＣＡＴ）、
ｅ）グリセロール－３－リン酸アシルトランスフェラーゼ（ＧＰＡＴ）、および
ｆ）リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ（ＬＰＡＡＴ）
よりなる群から選択されるアシルトランスフェラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子を含んでなる請求項１、２、３または４のいずれか一項に記載の組換え生産宿主。

【請求項２２】
前記ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ（ＤＧＡＴ１）が配列番号１２３、および１２５～１２９よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、前記ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ（ＤＧＡＴ２）が配列番号１３１、１３３、１３５、および１３７よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、前記リン脂質：ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ（ＰＤＡＴ）が配列番号１１８に記載のアミノ酸配列を有し、前記グリセロール－３－リン酸アシルトランスフェラーゼ（ＧＰＡＴ）が配列番号１３９に記載のアミノ酸配列を有し、前記リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ（ＬＰＡＡＴ）が配列番号１０９、１１３、および１１６よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、前記アシル－ＣｏＡ：１－アシルリゾホスファチジルコリンアシルトランスフェラーゼ（ＬＰＣＡＴ）が配列番号１２１に記載のアミノ酸配列を有する請求項２１に記載の組換え生産宿主。

【請求項２３】
ａ）Δ６デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、
ｂ）$C_{18/20}$エロンガーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、
ｃ）Δ５デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、
ｄ）Δ１７デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、
ｅ）$C_{20/22}$エロンガーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、
ｆ）Δ４デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、
ｇ）$C_{16/18}$エロンガーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、および、
ｈ）Δ１２デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子
のω－３／ω－６脂肪酸生合成経路の遺伝子を含んでなる遺伝子プールを含んでなる、背景ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）種を含んでなる、ドコサヘキサエン酸生産のための組換え生産宿主細胞であって、
背景ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）種が、オロチジン－５’－リン酸デカルボキシラーゼ（Ｕｒａ３）、イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ（Ｌｅｕ２）、アシル－ｃｏＡオキシダーゼ（Ｐｏｘ３）、アシル－ＣｏＡオキシダーゼ（Ｐｏｘ２）、Δ１２デサチュラーゼ、およびリパーゼ１（Ｌｉｐ１）よりなる群から選択される酵素をコードするあらゆる天然遺伝子を欠いている組換え生産宿主細胞。

【請求項２４】
ａ）ｉ．Δ６デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、およびC$_{18/20}$エロンガーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、およびΔ５デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、およびΔ１７デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、およびC$_{20/22}$エロンガーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、およびΔ４デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、
ｉｉ．Δ９エロンガーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、およびΔ８デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、およびΔ５デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、およびΔ１７デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、およびC$_{20/22}$エロンガーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、およびΔ４デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、
ｉｉｉ．Δ１５デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、Δ６デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、およびC$_{18/20}$エロンガーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、およびΔ５デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、およびC$_{20/22}$エロンガーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、およびΔ４デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、
ｉｖ．Δ１５デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、Δ９エロンガーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、およびΔ８デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、およびΔ５デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、およびC$_{20/22}$エロンガーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、およびΔ４デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子
よりなる群から選択される少なくとも１組の遺伝子、および
ｂ）ｉ．Δ１２デサチュラーゼ、
ｉｉ．Δ９デサチュラーゼ、
ｉｉｉ．C$_{14/16}$エロンガーゼ、
ｉｖ．C$_{16/18}$エロンガーゼ
よりなる群から選択される酵素をコードする少なくとも１つの遺伝子、および
ｃ）（ｉ）ＤＧＡＴ１、ＤＧＡＴ２、およびＰＤＡＴよりなる群から選択されるジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ、
（ｉｉ）アシル－ＣｏＡ：１－アシルリゾホスファチジルコリンアシルトランスフェラーゼ（ＬＰＣＡＴ）、
（ｉｉｉ）グリセロール－３－リン酸アシルトランスフェラーゼ（ＧＰＡＴ）、
（ｉｖ）リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ（ＬＰＡＡＴ）、
（ｖ）ホスホリパーゼＣ、および
（ｖｉ）ホスホリパーゼA$_2$
よりなる群から選択される酵素をコードする少なくとも１つの遺伝子
のω－３／ω－６脂肪酸生合成経路の遺伝子を含んでなる遺伝子プールを含んでなる、背景ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）種を含んでなる、ドコサヘキサエン酸生成のための組換え生産宿主細胞であって、
（１）背景ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）種が、Δ１２デサチュラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするあらゆる天然遺伝子を欠いており、
（２）背景ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）種が、リパーゼ１（Ｌｉｐ１－）、ペルオキシソームアシルＣｏＡオキシダーゼＡＣＯ３（Ｐｏｘ３－）、アシル－ＣｏＡオキシダーゼ２（Ｐｏｘ２－）、オロチジン－５’－リン酸デカルボキシラーゼ（Ｕｒａ３－）、サッカロピンデヒドロゲナーゼ（Ｌｙｓ５－）、リパーゼ２（Ｌｉｐ２－）、およびイソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ（Ｌｅｕ２－）よりなる群から選択される酵素をコードするあらゆる天然遺伝子を欠いている組換え生産宿主細胞。
【請求項２５】
宿主が全脂肪酸の％として少なくとも約５％のドコサヘキサエン酸を含んでなる微生物油を生成する請求項１、２、３または４のいずれか一項に記載の組換え生産宿主。

【請求項２６】
宿主がドコサヘキサエン酸を含んでなる微生物油を生成し、微生物油があらゆるγ－リノール酸を欠いている請求項２５に記載の組換え生産宿主。
【請求項２７】
ａ）請求項１、２、３、または４のいずれか一項に記載の生産宿主を培養して、ドコサヘキサエン酸を含んでなる微生物油が生成され、
ｂ）場合によりステップ（ａ）の微生物油を回収すること
を含んでなるドコサヘキサエン酸を含んでなる微生物油の生成方法。
【請求項２８】
請求項２７に記載の方法によって生成される微生物油。
【請求項２９】
油が少なくとも約５％のドコサヘキサエン酸を含有する請求項２８に記載の微生物油。
【請求項３０】
油があらゆるγ－リノール酸を欠いている請求項２８に記載の微生物油。
【請求項３１】
油がリノール酸、γ－リノレン酸、エイコサジエン酸、ジホモ－γ－リノール酸、アラキドン酸、α－リノレン酸、ステアリドン酸、エイコサトリエン酸、エイコサテトラエン酸、ドコサペンタエン酸、およびドコサヘキサエン酸よりなる群から選択される脂肪酸を含んでなる請求項２８に記載の混合油。
【請求項３２】
請求項２７に記載の方法によって生成される有効量の微生物油を含んでなる食品。
【請求項３３】
類似食品、肉製品、穀物製品、ベーカリー食品、スナック食品、および乳製品よりなる群から選択される請求項３２に記載の食品。
【請求項３４】
請求項２７に記載の方法によって生成される有効量の微生物油を含んでなる、メディカルフード、栄養補助食品、乳児用調製粉乳、および医薬品よりなる群から選択される製品。
【請求項３５】
請求項２７に記載の方法によって生成される有効量の微生物油を含んでなる動物飼料。
【請求項３６】
ペットフード、反芻動物飼料、家禽飼料、および水産養殖飼料よりなる群から選択される請求項３５に記載の動物飼料。
【請求項３７】
有効量の微生物油を含んでなり、場合により請求項１、２、３または４のいずれか一項に記載の組換え宿主を含んでなる酵母バイオマスを含んでなる動物飼料。
【請求項３８】
酵母バイオマスが、タンパク質、脂質、炭水化物、ビタミン、ミネラル、および核酸よりなる群から選択される飼料栄養素を含んでなる請求項３７に記載の動物飼料。
【請求項３９】
請求項２７に記載の方法によって生成される微生物油と食品とを組み合わせることを含んでなるドコサヘキサエン酸で栄養強化された食品の製造方法。
【請求項４０】
メディカルフード、栄養補助食品、乳児用調製粉乳、および医薬品よりなる群から選択される製品の製造方法であって、請求項２７に記載の方法によって生成される微生物油と製品とを組み合わせることを含んでなるドコサヘキサエン酸で製品が栄養強化される方法。
【請求項４１】
請求項２７に記載の方法によって生成される微生物油と動物飼料とを組み合わせることを含んでなるドコサヘキサエン酸で栄養強化された動物飼料の製造方法。

【請求項４２】
請求項３７に記載の動物飼料と飼料栄養素を含んでなる酵母バイオマスとを組み合わせることを含んでなるドコサヘキサエン酸を含んでなる動物飼料を飼料栄養素で栄養強化する方法。
【請求項４３】
飼料栄養素が、タンパク質、脂質、炭水化物、ビタミン、ミネラル、および核酸よりなる群から選択される請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
ヒトまたは動物によって消費可能または使用可能な形態でドコサヘキサエン酸を含有する請求項２７に記載の方法によって生成される微生物油を提供することを含んでなるエイコサペンタエン酸で強化された栄養補助食品をヒト、動物または水産養殖生物に提供する方法。
【請求項４５】
ドコサヘキサエン酸の欠乏症を処置するために、ヒトまたは動物によって消費可能または使用可能な形態でドコサヘキサエン酸を含有する請求項２７に記載の方法によって生成される微生物油を提供することを含んでなる動物またはヒトにおけるドコサヘキサエン酸の欠乏症の処置方法。
【請求項４６】
ＡＴＣＣ名称ＡＴＣＣ＿＿＿＿＿＿を有する、ドコサヘキサエン酸生産に有用な組換え生産宿主ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）Ｙ３００００。
【発明の詳細な説明】
【関連出願との関係】
【０００１】
本願は、その内容全体を参照によって本明細書に引用する、２００４年１１月４日に出願された米国仮特許出願第６０／６２４８１２号明細書の利益を主張する。
【技術分野】
【０００２】
本発明はバイオテクノロジー分野にある。より具体的には本発明は、ドコサヘキサエン酸（ω－３多価不飽和脂肪酸）を高濃度で効率的に生成できる、油性酵母ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）の組換え株に関する。
【背景技術】
【０００３】
ドコサヘキサエン酸（ＤＨＡ、ｃｉｓ－４，７，１０，１３，１６，１９－ドコサヘキサエン酸、Ｃ２２：６ω－３）は、脳機能の発育、機能性発達、および健康的維持に必須であり、乳児期から老齢に至るまで必要とされる（非特許文献１）。ＤＨＡ欠乏症は、胎児アルコール症候群、注意欠陥多動性障害、嚢胞性線維症、フェニルケトン尿症、単極性うつ病、攻撃的敵意、および副腎白質萎縮症と関係がある。対照的にＤＨＡの摂取増大は、炎症性疾患（例えば関節リウマチ）、タイプＩＩ糖尿病、高血圧、アテローム性動脈硬化、鬱病、心筋梗塞、血栓症、ある種の癌において、そしてアルツハイマー疾患などの変性障害発症の予防のために有益であり、または好ましい効果を有することが示されている。
【０００４】
魚（例えばサケ、マス、サバ）はこの長鎖脂肪酸を高濃度で自然に含有するため、それらは重要なＤＨＡ源である。豊富な研究に基づいて［（非特許文献２）でレビューされる］、米国心臓協会、全米コレステロール教育プログラム、世界保健機関、欧州心臓学会議、米国糖尿病協会、および英国栄養科学諮問パネルは、いずれも心臓保護効果のために毎週２回の魚の摂取を推奨する（各摂取は約４５０ｍｇ／日のＤＨＡおよびエイコサペンタエン酸（ＥＰＡ、Ｃ２０：５ω－３）当量を提供する）。このようにして、ＤＨＡは機能性食品、幼児栄養、バルク栄養、および動物の健康に関連する多様な製品に組み込まれる

。

【０００５】

ドコサペンタエン酸（ＤＰＡ、Ｃ２２：５ω－３）の生理学的機能についてはなおも未知であるが、この脂肪酸はＤＨＡの代謝前駆物質であり、鎖長延長を通じたＥＰＡのすぐ下流の生成物である。ＤＰＡはまた、魚油中に含有されることが知られているが、含有量は極めて低い。ＤＰＡの唯一の既知の機能は、医薬品を脳に輸送するキャリアとしてのその有用性である（特許文献１）。しかしＤＨＡ欠乏の代償としてＤＰＡが増大することが知られているので、ＤＰＡは動物の体内で生理学的役割を果たしているかもしれないことが予想される（非特許文献３）（非特許文献４）（非特許文献５）。したがってＤＰＡおよびＤＨＡのどちらも重要なω－３脂肪酸として考慮しなくてはならない。当業者はＤＨＡに向けたここでの教示が、ＤＰＡが将来望ましい生成物になれば、その生産にもおしなべて適用でき適切であることを認識するであろう。

【０００６】

ＤＨＡは異なるタイプの魚油および海洋性プランクトン中に自然に見られるが、このω－３脂肪酸の供給は高まる需要を満たすのに十分でないことが予期される。魚油は高度に不均一な組成を有し（したがってＤＨＡを濃縮するための大規模な精製を要する）、不快な味および臭いを有し（除去を経済的に困難にし、油を食物成分として許容できなくする）、重金属汚染物質の環境的生物濃縮および入手可能性の変動を被りやすい（天候、疾患または魚の乱獲のため）。

【０００７】

魚油の代替物として、ＤＨＡはまた微生物的にも生成できる。一般に微生物油生産は、適切な培養培地中でＤＨＡを自然に合成できる適切な微生物を培養して、（通常の細胞代謝過程で起きる）油合成をさせることを伴い、発酵培地からの微生物の分離、および細胞内油回収のための処理が続く。利用する特定微生物に基づいて、多数の異なるプロセスが存在する［例えば、シゾキトリウム（Ｓｃｈｉｚｏｃｈｙｔｒｉｕｍ）種（特許文献２）（特許文献３）、ウルケニア（Ｕｌｋｅｎｉａ）（特許文献４）、シュードモナス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）種ＹＳ－１８０（特許文献５）、スラウストキトリウム（Ｔｈｒａｕｓｔｏｃｈｙｔｒｉｕｍ）属株ＬＦＦ１（特許文献６）、クリプテコジニウム・コーニイ（Ｃｒｙｐｔｈｅｃｏｄｉｎｉｕｍ　ｃｏｈｎｉｉ）（特許文献７）（非特許文献６）（非特許文献７）、エミリアニア（Ｅｍｉｌｉａｎｉａ）種（特許文献８）１９９３年、およびジャポノキトリウム（Ｊａｐｏｎｏｃｈｙｔｒｉｕｍ）種（ＡＴＣＣ＃２８２０７）（特許文献９）１９８９年］。さらに次の微生物もＤＨＡを生成する能力を有することが知られている。ビブリオ・マリナス（Ｖｉｂｒｉｏ　ｍａｒｉｎｕｓ）（深海から単離された細菌、ＡＴＣＣ＃１５３８１）と、微細藻類キクロテラ・クリプティカ（Ｃｙｃｌｏｔｅｌｌａ　ｃｒｙｐｔｉｃａ）およびイソクリシス・ガルバナ（Ｉｓｏｃｈｒｙｓｉｓ　ｇａｌｂａｎａ）と、スラウストキトリウム・アウレウム（Ｔｈｒａｕｓｔｏｃｈｙｔｒｉｕｍ　ａｕｒｅｕｍ）（ＡＴＣＣ＃３４３０４）（非特許文献８）およびＡＴＣＣ＃２８２１１、ＡＴＣＣ＃２０８９０、およびＡＴＣＣ＃２０８９１と命名されたスラウストキトリウム（Ｔｈｒａｕｓｔｏｃｈｙｔｒｉｕｍ）種などの有鞭毛真菌。そしてこれらのプロセスのいくつかは様々な制限の結果として工業的商品化には適応できないが、ＤＨＡの商業的生産のために少なくとも３つの次の異なる発酵プロセスがある。ＤＨＡＳＣＯ^{TM}生産のためのＣ．コーニイ（ｃｏｈｎｉｉ）の発酵（メリーランド州コロンビアのマーテック・バイオサイエンス社（Ｍａｒｔｅｋ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ（Ｃｏｌｕｍｂｉａ，ＭＤ））、以前にＤＨＡＧｏｌｄとして知られていた油の生産のためのシゾキトリウム（Ｓｃｈｉｚｏｃｈｙｔｒｉｕｍ）種の発酵（マーテック・バイオサイエンス社（Ｍａｒｔｅｋ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）、およびＤＨａｃｔｉｖｅ^{TM}生産のためのウルケニア（Ｕｌｋｅｎｉａ）種の発酵（ドイツ国フランクフルトのニュートリノバ（Ｎｕｔｒｉｎｏｖａ（Ｆｒａｎｋｆｕｒｔ，Ｇｅｒｍａｎｙ））。これらの成功にもかかわらず、発酵は微生物それ自身の自然の能力に依存するために、これらの各方法には、油の収率を実質的に改善できず、または生

成された油組成物の特性を調節できないという欠点がある。

【０００８】

したがって組換え手段を使用したＤＨＡの微生物生産は、天然微生物源からの生成に比べていくつかの利点を有することが予期される。例えば宿主中への新しい生合成経路の導入によって、および／または望まれない経路の抑止によって、宿主の天然由来微生物脂肪酸プロフィールを改変し、それによって所望ＰＵＦＡ（またはその抱合形態）の生成レベルの増大をもたらし、望まれないＰＵＦＡの生成を低減することができるので、油生成に好ましい特性を有する組換え微生物を使用できる。第２に組換え微生物は、特異的用途を有するかもしれない特定形態でＰＵＦＡを提供できる。そして、最終的に培養条件を調節することで、とりわけ微生物的発現酵素の特定基質源を提供することで、または望まれない生化学的経路を抑止するための化合物の添加／遺伝子操作によって、微生物油生産を操作できる。したがって例えばその他のＰＵＦＡ下流または上流生成物の顕著な蓄積なしに、このようにして生成されたω－３対ω－６脂肪酸比率を修正し、または特定のＰＵＦＡ（例えばＤＨＡ）生成を操作することが可能である。

【０００９】

まず、そして、ＤＨＡの微生物的生成は中間脂肪酸、ＥＰＡの合成を必要とする。ほとんどの微生物的に生成されたＤＨＡは、（主に高等植物、藻類、コケ、真菌、線形動物、およびヒトに見られる）Δ６デサチュラーゼ／エロンガーゼ経路を通じて合成され、そこでは１．）Δ１２デサチュラーゼの作用によってオレイン酸がＬＡに変換され、２．）場合によりΔ１５デサチュラーゼの作用によってＬＡがＡＬＡに変換され、３．）Δ６デサチュラーゼの作用によってＬＡがＧＬＡに変換され、および／またはＡＬＡがＳＴＡに変換され、３．）$C_{18/20}$エロンガーゼの作用によってＧＬＡがＤＧＬＡに変換され、および／またはＳＴＡがＥＴＡに変換され、３．）Δ５デサチュラーゼの作用によってＤＧＬＡがＡＲＡに変換され、および／またはＥＴＡがＥＰＡに変換され、および４．）場合によりΔ１７デサチュラーゼの作用によってＡＲＡがＥＰＡに変換される（図１）。しかしＥＰＡ生合成のための代案のΔ９エロンガーゼ／Δ８デサチュラーゼ経路がユーグレナ種などのいくつかの生物で作動し、そこではそれがC_{20}ＰＵＦＡ形成のための支配的経路である（非特許文献９、特許文献１０および非特許文献１０）。この経路では上述のように、１．）Δ９エロンガーゼによってＬＡおよびＡＬＡがＥＤＡおよびＥＴｒＡにそれぞれ変換され、２．）Δ８デサチュラーゼによってＥＤＡおよびＥＴｒＡがＤＧＬＡおよびＥＴＡにそれぞれ変換され、３．）ＤＧＬＡおよびＥＴＡが最終的にＥＰＡに変換される。ＥＰＡ合成に際して、$C_{20/22}$エロンガーゼは基質のＤＰＡへの変換に関与し、Δ４デサチュラーゼによる不飽和化がそれに続いてＤＨＡが生じる。

【００１０】

文献は、様々な比率のω－３／ω－６ＰＵＦＡ生合成経路がサッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）（非油性酵母）に導入されるいくつかの最近の例を報告する。具体的には（非特許文献１１）はリノレン酸の合成を報告し、（Ｋｎｕｔｚｏｎ）らに付与された（特許文献１１）はリノール酸（ＬＡ）、γ-リノレン酸（ＧＬＡ）、ＡＬＡ、およびステアリドン酸（ＳＴＡ）の生産を実証した。（非特許文献１２）はＥＰＡの生産について述べ、（非特許文献１３）はＤＨＡ（全脂肪酸の３．８％、ＥＰＡを基質として供給）を初めて生成した。しかしこれらの成功にもかかわらず、商業的量のＤＨＡ（すなわち全脂肪酸に対して５～３０％を超える）の経済的生産を可能にする複雑な代謝操作は報告されていない。さらにこのような操作のための宿主生物の最適の選択に関わる相当な矛盾が存在する。

【００１１】

最近、ピカタッジョ（Ｐｉｃａｔａｇｇｉｏ）ら、特許文献１２および同時係属出願である特許文献１３は、ＡＲＡ、ＥＰＡおよびＤＨＡなどのＰＵＦＡの生成のための好ましいクラスの微生物としての油性酵母、具体的にはヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）（以前はカンジダ・リポリチカ（Ｃａｎｄｉｄａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）として分類された）の有用性を探求した。油性酵母は自然に油合成お

よび蓄積ができる酵母として定義され、油蓄積は細胞乾燥重量の約８０％に達することができる。これらの生物におけるω－６およびω－３脂肪酸生成の自然の欠如にもかかわらず（自然に生成されるＰＵＦＡは１８：２脂肪酸（そしてそれほど多くはないが１８：３脂肪酸）に限定されるので）、ピカタッジョ（Ｐｉｃａｔａｇｇｉｏ）ら、特許文献９は、比較的単純な遺伝子操作アプローチを利用したＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）における（全脂肪酸の）１．３％のＡＲＡおよび１．９％のＥＰＡの生成、かつより複雑な代謝エンジニアリングを使用した２８％以下のＥＰＡの生成を実証した。しかしながら、特定の宿主生物におけるＤＨＡの経済的な商業生産を可能にする、同様の研究は実施されていない。

【００１２】

本出願人は、Δ６デサチュラーゼ／Δ６エロンガーゼ経路を使用して、全油画分中に５％を超えるＤＨＡを生成できるヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）の様々な株を操作することで、既述の問題を解決した。この油性酵母におけるＤＨＡ生産性をさらに増強する追加的代謝操作および発酵方法、ならびにΔ９エロンガーゼ／Δ８ デサチュラーゼ経路を通じてＤＨＡの生産を可能にする方法（それによってＧＬＡを欠くＤＨＡ含有油を生成する）を提供する。

【００１３】

【特許文献１】特公昭６１（１９８６）－２０４１３６号公報
【特許文献２】米国特許第５，３４０，７４２号明細書
【特許文献３】米国特許第６，５８２，９４１号明細書
【特許文献４】米国特許第６，５０９，１７８号明細書
【特許文献５】米国特許第６，２０７，４４１号明細書
【特許文献６】米国特許出願公開第２００４／０１６１８３１　Ａ１号明細書
【特許文献７】米国特許出願公開第２００４／００７２３３０　Ａ１号明細書
【特許文献８】特開平５（１９９３）－３０８９７８号公報
【特許文献９】特開平１（１９８９）－９９５８８号公報
【特許文献１０】国際公開第００／３４４３９号パンフレット
【特許文献１１】米国特許第６，１３６，５７４号明細書
【特許文献１２】国際公開第２００４／１０１７５７号パンフレット
【特許文献１３】米国特許仮出願第６０／６２４８１２号明細書
【非特許文献１】ホロックス（Ｈｏｒｒｏｃｋｓ），Ｌ．Ａ．およびＹ．Ｋ．イョオ（Ｙｅｏ）著、「Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｒｅｓ．」４０（３）：２１１～２２５頁（１９９９年）
【非特許文献２】「２００５年度米国食生活指針諮問委員会報告（２００５ Ｄｉｅｔａｒｙ Ｇｕｉｄｅｌｉｎｅｓ Ａｄｖｉｓｏｒｙ Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ Ｒｅｐｏｒｔ ｆｏｒ Ａｍｅｒｉｃａｎｓ）パートＤ第４節（米国保健社会福祉省および米国農務省の連係による）
【非特許文献３】ホマユーン（Ｈｏｍａｙｏｕｎ）ら著、「Ｊ．Ｎｅｕｒｏｃｈｅｍ．」５１：４５頁（１９８８年）
【非特許文献４】ハム（Ｈａｍｍ）ら著、「Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．」２４５：９０７頁（１９８７年）
【非特許文献５】レビュング（Ｒｅｂｈｕｎｇ）ら著、「Ｂｉｏｓｃｉ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．」５８：３１４頁（１９９４年）
【非特許文献６】デスワーフ（ｄｅ Ｓｗａａｆ），Ｍ．Ｅ．ら著、「Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ Ｂｉｏｅｎｇ．」８１（６）：６６６～７２頁（２００３年）
【非特許文献７】デスワーフ（ｄｅ Ｓｗａａｆ），Ｍ．Ｅ．ら著、「Ａｐｐｌ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．」６１（１）：４０～３頁（２００３年）
【非特許文献８】ケンドリック（Ｋｅｎｄｒｉｃｋ）著、「Ｌｉｐｉｄｓ」，２７：１５ページ（１９９２年）
【非特許文献９】ウォリス（Ｗａｌｌｉｓ），Ｊ．Ｇ．，およびブラウズ（Ｂｒｏｗ

ｓｅ），「Ｊ．　Ａｒｃｈ．　Ｂｉｏｃｈｅｍ．　Ｂｉｏｐｈｙｓ．」３６５：３０７－３１６頁（１９９９年）
【非特許文献１０】キ（Ｑｉ，Ｂ．）ら．　「ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔｅｒｓ．」　５１０：１５９－１６５頁（２００２年）
【非特許文献１１】ダイヤー（Ｄｙｅｒ），Ｊ．Ｍ．ら著、「Ａｐｐｌ．Ｅｎｉｖ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．」，５９：２２４～２３０頁（２００２年）
【非特許文献１２】ドマーグ（Ｄｏｍｅｒｇｕｅ），Ｆ．ら著、「Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．」２６９：４１０５～４１１３頁（２００２年）
【非特許文献１３】ペレイラ（Ｐｅｒｅｉｒａ），Ｓ．Ｌ．ら著、「Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．」３８４：３５７～３６６頁（２００４年）

【発明の開示】
【課題を解決するための手段】
【００１４】
本発明は、ドコサヘキサエン酸（ＤＨＡ）を生成するように組換えられた生産宿主、該宿主を生成する方法、および本発明の組換え宿主によって生成された微生物油を含有する食品に関する。
【００１５】
したがって、一実施形態において、本発明は、
ａ）Δ６デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、
ｂ）$C_{18/20}$エロンガーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、
ｃ）Δ５デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、
ｄ）Δ１７デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子
ｅ）$C_{20/22}$エロンガーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、および
ｆ）Δ４デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、
のω－３／ω－６脂肪酸生合成経路遺伝子を含んでなる遺伝子プールを含んでなる、背景ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）種を含んでなる、エイコサペンタエン酸生成のための組換え生産宿主細胞を提供する。
【００１６】
別の実施形態では、本発明は、
ａ）Δ１５デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、
ｂ）Δ６デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、
ｃ）$C_{18/20}$エロンガーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、
ｄ）Δ５デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子
ｅ）$C_{20/22}$エロンガーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、および、
ｆ）Δ４デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、
のω－３／ω－６脂肪酸生合成経路の遺伝子を含んでなる遺伝子プールを含んでなる、背景ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）種を含んでなる、ドコサヘキサエン酸生成のための組換え生産宿主細胞を提供する。
【００１７】
他の実施形態では、本発明は、
ａ）Δ９エロンガーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、
ｂ）Δ８デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、
ｃ）Δ５デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、
ｄ）Δ１７デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子
ｅ）$C_{20/22}$エロンガーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、および、
ｆ）Δ４デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、
のω－３／ω－６脂肪酸生合成経路の遺伝子を含んでなる遺伝子プールを含んでなる、背景ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）種を含んでなる、ドコサヘキサエン酸生成のための組換え生産宿主細胞を提供する。
【００１８】

別の実施形態では、本発明は、
ａ）Δ１５デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、
ｂ）Δ９エロンガーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、
ｃ）Δ８デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、
ｄ）Δ５デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子
ｅ）$C_{20/22}$エロンガーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子、および、
ｆ）Δ４デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子
のω－３／ω－６脂肪酸生合成経路の遺伝子を含んでなる遺伝子プールを含んでなる、背景ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）種を含んでなる、ドコサヘキサエン酸生成のための組換え生産宿主細胞を提供する。

【００１９】
好ましい実施形態では、本発明の生産宿主は、場合によりΔ１２デサチュラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子を含んでなる。別の好ましい実施形態では、本発明は全脂肪酸の％として少なくとも約５％のドコサヘキサエン酸を有する微生物油を生成する組換え生産宿主を提供する。

【００２０】
別の実施形態では、本発明は、
ａ）本発明の生産宿主を培養し、ドコサヘキサエン酸を含んでなる微生物油が生成されるステップと、
ｂ）場合によりステップ（ａ）の微生物油を回収するステップ
を含んでなるドコサヘキサエン酸を含んでなる微生物油の生産方法を提供する。

【００２１】
別の実施形態では、本発明は、本発明の方法および生産宿主によって作られる微生物油を提供する。好ましい実施形態では、本発明の微生物油はＤＨＡを含有するが、あらゆるγ－リノール酸を欠いている。

【００２２】
別の実施形態では、本発明は、本発明の方法によって生成された微生物油の有効量を含んでなる食品を提供する。代案としては本発明は、本発明の方法によって生成された微生物油の有効量を含んでなる、メディカルフード、栄養補助食品、乳児用調製粉乳、および医薬品よりなる群から選択される製品を提供する。

【００２３】
代案としては、本発明の方法によって生成された微生物油の有効量を含んでなる本発明動物飼料を提供する。

【００２４】
別の実施形態では、本発明は、ヒトまたは動物によって消費可能または使用可能な形態でドコサヘキサエン酸を含有する、本発明の方法によって生成された微生物油を提供するステップを含んでなる、エイコサペンタエン酸で強化されたヒト、動物または水産養殖生物栄養補助食品を提供する方法を提供する。

【００２５】
代案としては本発明は、ドコサヘキサエン酸欠乏症を処置するヒトまたは動物によって消費可能または使用可能な形態でドコサヘキサエン酸を含有する、本発明の方法によって生成された微生物油を提供するステップを含んでなる、動物またはヒトにおいて前記欠乏症を処置する方法を提供する。

【００２６】
生物学的寄託
以下の命名、登録番号、および寄託日を有する以下の生物材料をバージニア州マナッサス（Ｍａｎａｓｓａ，ＶＡ）２０１１０－２２０９ユニバーシティ・ブールヴァード１０８０１の米国微生物系統保存機関（ＡＴＣＣ）に寄託した。

【００２７】

【表１】

生物材料	登録番号	寄託日
プラスミドpY89-5	ATCC PTA-6048	2004年6月4日
ヤロウィア・リポリティカ Y2047	ATCC PTA-____	
ヤロウィア・リポリティカ Y2096	ATCC PTA-____	
ヤロウィア・リポリティカ Y2201	ATCC PTA-____	
ヤロウィア・リポリティカ Y3000	ATCC PTA-____	

【００２８】
本願明細書の一部を形成する以下の詳細な説明および添付の配列説明によって、本発明をより完全に理解できるであろう。
【００２９】
以下の配列は、３７Ｃ．Ｆ．Ｒ．§１．８２１～１．８２５（「ヌクレオチド配列および／またはアミノ酸配列開示を含む特許出願の要件－配列規則」）を満たし、世界知的所有権機関（ＷＩＰＯ）標準ＳＴ．２５（１９９８）およびＥＰＯおよびＰＣＴの配列表要件（規則５．２および４９．５（ａの２）、および実施細則第２０８号および附属書Ｃ）に一致する。ヌクレオチドおよびアミノ酸配列データのために使用される記号および型式は、３７Ｃ．Ｆ．Ｒ．§１．８２２で述べられる規則に従う。
【００３０】
配列番号１～１５３、および２１０～２２１は、表１で同定されるプロモーター、遺伝子またはタンパク質（またはその断片）をコードするＯＲＦである。
【００３１】
【表２】

表1

遺伝子およびタンパク質配列番号の要約

説明	核酸 配列番号	タンパク質 配列番号
*モルティエラ・アルピナ*Δ6デサチュラーゼ	1 (1374 bp)	2 (457 AA)
*ヤロウィア・リポリティカ*中での発現のためにコドン最適化された*モルティエラ・アルピナ*由来合成Δ6デサチュラーゼ	3 (1374 bp)	2 (457 AA)
*モルティエラ・アルピナ*Δ6デサチュラーゼ「B」	4 (1521 bp)	5 (458 AA)

【００３２】

【表３】

*モルティエラ・アルピナ*Δ5デサチュラーゼ	6 (1341 bp)	7 (446 AA)
イソクリシス・ガルバナΔ5デサチュラーゼ	8 (1329 bp)	9 (442 AA)
*ヤロウィア・リポリティカ*中での発現のためにコドン最適化されたイソクリシス・ガルバナ由来合成Δ5デサチュラーゼ	10 (1329 bp)	9 (442 AA)
ヒトΔ5デサチュラーゼ	11 (1335 bp)	12 (444 AA)
*ヤロウィア・リポリティカ*中での発現のためにコドン最適化されたヒト由来合成Δ5デサチュラーゼ	13 (1335 bp)	12 (444 AA)
ゼブラフィッシュ Δ5/Δ6デサチュラーゼDrd6/d5（V）（ジェンバンク登録番号AF309556）	14 (1590 bp)	15 (444 AA)
ゼブラフィッシュΔ5/Δ6デサチュラーゼ（ジェンバンク登録番号BC068224）	16 (1946 bp)	---
ゼブラフィッシュΔ5/Δ6デサチュラーゼ突然変異体Drd6/d5（M）	17 (1335 bp)	18 (444 AA)
サプロレグニア・ディクリナΔ17デサチュラーゼ	19 (1077 bp)	20 (358 AA)
*ヤロウィア・リポリティカ*中での発現のためにコドン最適化されたサプロレグニア・ディクリナ由来合成Δ17デサチュラーゼ遺伝子	21 (1077 bp)	20 (358 AA)
モルティエラ・アルピナ$C_{18/20}$エロンガーゼ	22 (957 bp)	23 (318 AA)
*ヤロウィア・リポリティカ*中での発現のためにコドン最適化された*モルティエラ・アルピナ*由来合成$C_{18/20}$エロンガーゼ遺伝子	24 (957 bp)	23 (318 AA)
スラウストキトリウム・アウレウム$C_{18/20}$エロンガーゼ	25 (819 bp)	26 (272 AA)
*ヤロウィア・リポリティカ*中での発現のためにコドン最適化されたスラウストキトリウム・アウレウム由来合成$C_{18/20}$エロンガーゼ遺伝子	27 (819 bp)	26 (272 AA)
*ヤロウィア・リポリティカ*Δ12デサチュラーゼ	28 (1936 bp)	29 (419 AA)
モルティエラ・イザベリナΔ12デサチュラーゼ	30 (1203 bp)	31 (400 AA)
フザリウム・モニリフォルメΔ12デサチュラーゼ	32 (1434 bp)	33 (477 AA)
アスペルギルス・ニデュランスΔ12デサチュラーゼ	34 (1416 bp)	35 (471 AA)
黄色コウジ菌（Aspergillus flavus）Δ12デサチュラーゼ	--	36 (466 AA)
アスペルギルス・フミガーツスΔ12デサチュラーゼ	--	37 (424 AA)
マグナポルテ・グリセアΔ12デサチュラーゼ	38 (1656 bp)	39 (551 AA)
ニューロスポラ・クラッサΔ12デサチュラーゼ	40 (1446 bp)	41 (481 AA)
フザリウム・グラミネアリウムΔ12デサチュラーゼ	42 (1371 bp)	43 (456 AA)
*モルティエラ・アルピナ*Δ12デサチュラーゼ	44 (1403 bp)	45 (400 AA)
サッカロミセス・クリヴェリΔ12デサチュラーゼ	--	46 (416 AA)
クリヴェロミセス・ラクチスΔ12デサチュラーゼ	47 (1948 bp)	48 (415 AA)

【００３３】

【表４】

カンジダ・アルビカンスΔ12デサチュラーゼ	--	49 (436 AA)
デバリオミセス・ハンセニCBS767Δ12デサチュラーゼ	--	50 (416 AA)
フザリウム・モニリフォルメΔ15デサチュラーゼ	51 (1209 bp)	52 (402 AA)
アスペルギルス・ニデュランスΔ15デサチュラーゼ	53 (1206 bp)	54 (401 AA)
マグナポルテ・グリセアΔ15デサチュラーゼ	55 (1185 bp)	56 (394 AA)
ニューロスポラ・クラッサΔ15デサチュラーゼ	57 (1290 bp)	58 (429 AA)
フザリウム・グラミネアリウムΔ15デサチュラーゼ	59 (1212 bp)	60 (403 AA)
*モルティエラ・アルピナ*Δ15デサチュラーゼ	61 (1353 bp)	62 (403 AA)
クリヴェロミセス・ラクチスΔ15デサチュラーゼ	63 (1248 bp)	64 (415 AA)
カンジダ・アルビカンスΔ15デサチュラーゼ	--	65 (433 AA)
サッカロミセス・クリヴェリΔ15デサチュラーゼ	--	66 (419 AA)
デバリオミセス・ハンセニCBS767Δ15デサチュラーゼ	--	67 (435 AA)
アスペルギルス・フミガーツスΔ15デサチュラーゼ	--	68 (396 AA)
イソクリシス・ガルバナΔ9エロンガーゼ	69 (792 bp)	70 (263 AA)
*ヤロウィア・リポリティカ*中での発現のためにコドン最適化された合成Δ9エロンガーゼ遺伝子	71 (792 bp)	70 (263 AA)
ミドリムシΔ8デサチュラーゼ遺伝子（非機能性、ジェンバンク登録番号AAD45877）	72 (1275 bp)	73 (419 AA)
ミドリムシΔ8デサチュラーゼ遺伝子（非機能性、ウォリス（Wallis）ら著、Archives of Biochem. Biophys.、365：307～316頁（1999年）、国際公開第00/34439号パンフレット）	--	74 (422 AA)
*ヤロウィア・リポリティカ*中での発現のためにコドン最適化された合成Δ8デサチュラーゼ遺伝子（D8S-1）	75 (1270 bp)	--
*ヤロウィア・リポリティカ*中での発現のためにコドン最適化された合成Δ8デサチュラーゼ遺伝子（D8S-3）	76 (1269 bp)	--
ミドリムシΔ8デサチュラーゼ遺伝子（Eg5）	77 (1271 bp)	78 (421 AA)
ミドリムシΔ8デサチュラーゼ遺伝子（Eg12）	79 (1271 bp)	80 (421 AA)
*ヤロウィア・リポリティカ*中での発現のためにコドン最適化された合成Δ8デサチュラーゼ遺伝子（D8SF）	81 (1272 bp)	82 (422 AA)
ドブネズミ$C_{16/18}$エロンガーゼ	83 (2628 bp)	84 (267 AA)
*ヤロウィア・リポリティカ*中での発現のためにコドン最適化されたドブネズミ由来合成$C_{16/18}$エロンガーゼ遺伝子	85 (804 bp)	84 (267 AA)
モルティエラ・アルピナ$C_{16/18}$エロンガーゼ（ELO3）	86 (828 bp)	87 (275 AA)

【００３４】

【表５】

(ELO3)		
*モルティエラ・アルピナ*ELO3、部分的cDNA配列	88 (607 bp)	--
ゲノム歩行によって得られた*モルティエラ・アルピナ*ELO3、3'配列	89 (1042 bp)	--
ゲノム歩行によって得られた*モルティエラ・アルピナ*ELO3、5'配列	90 (2223 bp)	--
*モルティエラ・アルピナ*ELO3、cDNAコンティグ	91 (3557 bp)	--
*モルティエラ・アルピナ*ELO3、イントロン	92 (542 bp)	--
*モルティエラ・アルピナ*ELO3、ゲノムコンティグ	93 (4099 bp)	--
ヤロウィア・リポリティカ$C_{16/18}$エロンガーゼ遺伝子	94 (915 bp)	95 (304 AA)
カンジダ・アルビカンス概然的脂肪酸エロンガーゼ(ジェンバンク登録番号EAL04510)	--	96 (353 AA)
ヤロウィア・リポリティカ$C_{14/16}$エロンガーゼ遺伝子	97 (978 bp)	98 (325 AA)
ニューロスポラ・クラッサFEN1遺伝子(ジェンバンク登録番号CAD70918)	--	99 (337 AA)
オストレオコッカス・タウリ$C_{20/22}$エロンガーゼ	100 (903 bp)	101 (300 AA)
*ヤロウィア・リポリティカ*中での発現のためにコドン最適化されたオストレオコッカス・タウリ由来合成$C_{20/22}$エロンガーゼ遺伝子	102 (903 bp)	103 (300 AA)
スラウストキトリウム・アウレウムΔ4デサチュラーゼ	104 (1548 bp)	105 (515 AA)
*ヤロウィア・リポリティカ*中での発現のためにコドン最適化されたスラウストキトリウム・アウレウム由来合成Δ4デサチュラーゼ遺伝子	106 (1545 bp)	107 (514 AA)
*モルティエラ・アルピナ*リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ(LPAAT1)	108 (945 bp)	109 (314 AA)
*モルティエラ・アルピナ*リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ(LPAAT2)	110 (927 bp)	111 (308 AA)
*ヤロウィア・リポリティカ*リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ(LPAAT1)	112 (1549 bp)	113 (282 AA)
*ヤロウィア・リポリティカ*リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ(LPAAT2)、遺伝子を含んでなるゲノム断片	114 (1495 bp)	--
*ヤロウィア・リポリティカ*リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ(LPAAT2)	115 (672 bp)	116 (223 AA)
*ヤロウィア・リポリティカ*リン脂質:ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ(PDAT)	117 (2326 bp)	118 (648 AA)
*ヤロウィア・リポリティカ*アシル-CoA:ステロール-アシルトランスフェラーゼ(ARE2)	119 (1632 bp)	120 (543 AA)

【００３５】

【表６】

シノラブディス・エレガンスアシル-CoA：1-アシルリゾホスファチジルコリンアシルトランスフェラーゼ（LPCAT）	--	121 (282 AA)
*ヤロウィア・リポリティカ*ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ（DGAT1）	122 (1578 bp)	123 (526 AA)
*モルティエラ・アルピナ*ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ（DGAT1）	124 (1578 bp)	125 (525 AA)
ニューロスポラ・クラッサジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ（DGAT1）	--	126 (533 AA)
ジベレラ・ゼアエPH-1ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ（DGAT1）	--	127 (499 AA)
マグナポルテ・グリセアジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ（DGAT1）	--	128 (503 AA)
アスペルギルス・ニデュランスジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ（DGAT1）	--	129 (458 AA)
*ヤロウィア・リポリティカ*ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ（DGAT2）	130 (2119 bp) 132 (1380 bp) 134 (1068 bp)	131 (514 AA) 133 (459 AA) 135 (355 AA)
*モルティエラ・アルピナ*ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ（DGAT2）	136 (996 bp)	137 (331 AA)
*モルティエラ・アルピナ*グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ（GPAT）	138 (2151 bp)	139 (716 AA)
M.アルピナGPAT、部分的cDNA配列	140 (1212 bp)	--
M.アルピナGPAT、-1050bp～+2886bp領域を含んでなるゲノム断片	141 (3935 bp)	--
ゲノム歩行によって得られたM.アルピナGPAT、3'cDNA配列	142 (965 bp)	--
ゲノム歩行によって得られたM.アルピナGPAT、5'配列	143 (1908 bp)	--
ゲノム歩行によって得られたM.アルピナGPAT、部配列	144 (966 bp)	--
M.アルピナGPAT-イントロン ＃1	145 (275 bp)	--
M.アルピナGPAT-イントロン ＃2	146 (255 bp)	--
M.アルピナGPAT-イントロン ＃3	147 (83 bp)	--
M.アルピナGPAT-イントロン ＃4	148 (99 bp)	--
*ヤロウィア・リポリティカ*ジアシルグリセロールコリンホスホトランスフェラーゼ（CPT1）、遺伝子を含んでなるゲノム断片	149 (2133 bp)	--
*ヤロウィア・リポリティカ*ジアシルグリセロールコリンホスホトランスフェラーゼ（CPT1）	150 (1185 bp)	151 (394 AA)
サッカロミセス・セレヴィシエイノシトールホスホスフィンゴリン脂質特異的ホスホリパーゼC（ISC1）	152 (1434 bp)	153 (477 AA)
*ヤロウィア・リポリティカ*グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼプロモーター（GPD）	210 (971 bp)	--

【００３６】

【表７】

*ヤロウィア・リポリティカ*グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ+イントロンプロモーター（GPDIN）	211 (1174 bp)	--
*ヤロウィア・リポリティカ*ホスホグリセリン酸ムターゼプロモーター（GPM）	212 (878 bp)	--
*ヤロウィア・リポリティカ*フルクトース-ビスリン酸アルドラーゼプロモーター（FBA）	213 (1001 bp)	--
*ヤロウィア・リポリティカ*フルクトース-ビスリン酸アルドラーゼ+イントロンプロモーター（FBAIN）	214 (973 bp)	--
*ヤロウィア・リポリティカ*フルクトース-ビスリン酸アルドラーゼ+変性イントロンプロモーター（FBAINm）	215 (924 bp)	--
*ヤロウィア・リポリティカ*グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼプロモーター（GPAT）	216 (1130 bp)	--
*ヤロウィア・リポリティカ*アンモニウム輸送体プロモーター（YAT1）	217 (778 bp)	--
*ヤロウィア・リポリティカ*翻訳延長因子EF1-αプロモーター（TEF）	218 (436 bp)	--
*ヤロウィア・リポリティカ*キメラGPM::FBAイントロンプロモーター（GPM::FBAIN）	219 (1020 bp)	--
*ヤロウィア・リポリティカ*キメラGPM::GPDイントロンプロモーター（GPM::GPDIN）	220 (1052 bp)	--
*ヤロウィア・リポリティカ*輸出タンパク質プロモーター（EXP1）	221 (1000 bp)	--

【００３７】
配列番号１５４および１５６－２０９は表２に同定されるプラスミドである。
【００３８】
【表８】

表2

プラスミド配列番号の要約

ラスミド	対応図	配列番号
pY5-30	6A	154（8,953bp）
pKUNF12T6E	8A	156（12,649bp）
pDMW271	8B	157（13,034bp）
pZP3L37	8C	158（12,690bp）
pZKUT16	8D	159（5,833bp）
pKO2UM25E	8E	160（12,663bp）
pDMW303	9A	161（15,996bp）
pZUF17	9B	162（8,165bp）
pZUF4	-	163（8,633bp）
pZUF4S	9C	164（8,633bp）
pZP2FOEN4	9E	165（10,660bp）
pKUNT2	10A	166（6,457bp）

【００３９】

【表９】

pDMW237	10B	167(7,879bp)
pY54PC	-	168(8,502bp)
pKUNFmkF2	10E	169(7,145bp)
pZF5T-PPC	13B	170(5,553bp)
pDMW297	13D	171(10,448bp)
pZP2C16M899	14A	172(15,543bp)
pDMW314	14B	173(13,295bp)
pDMW325	14C	174(15,559bp)
pZKSL5598	14D	175(16,325bp)
pY72	15A	176(10,189bp)
pY80	15B	177(12,558bp)
pY79	15C	178(8,982bp)
pY86	15D	179(10,424bp)
pY94	16A	180(10,485bp)
pY91M	16B	181(8,423bp)
pDMW232	16C	182(10,945bp)
pY37/F15	16D	183(8,194bp)
pKO2UF2PE	17A	184(10,838bp)
pZKUGPI5S	17B	185(6,912bp)
pDMW302T16	17C	186(14,864bp)
pZKUGPE1S	-	187(6,540bp)
pKO2UM26E	17D	188(13,321bp)
pZKUM	-	189(4,313bp)
pMLPAT-17	-	190(8,015bp)
pMLPAT-Int	-	191(8,411bp)
pZUF-MOD-1	18A	192(7,323bp)
pMDGAT1-17	18B	193(8,666bp)
pMDGAT2-17	-	194(8,084bp)
pMGPAT-17	18C	195(9,239bp)
pZF5T-PPC-E3	-	196(5,031bp)
pZUF6S	21A	197(8,462bp)
pZUF6S-E3WT	21B	198(11,046bp)
pZKUGPYE1-N	21C	199(6,561bp)
pZKUGPYE2	21D	200(6,498bp)
pZUF6TYE2	-	201(10,195bp)
pZKUGPYE1	22A	202(6,561bp)
pZUF6FYE1	22B	203(10,809bp)
pYCPT1-17	-	204(8,273bp)
pZP2I7+Ura	22C	205(7,822bp)
pYCPT1-ZP2I7	-	206(7,930bp)
pTEF::ISC1	-	207(8,179bp)
pY20	22D	208(8,196bp)
pLV13	22E	209(5,105bp)

【００４０】

配列番号１５５は、ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）種中で最適に発現される遺伝子のコドン最適化翻訳開始部位に対応する。

【００４１】

配列番号２２２は、真菌Δ１５およびΔ１２デサチュラーゼに見られるＨｉｓ　Ｂｏｘ

１モチーフに対応する。

【００４２】

配列番号２２３は、真菌タンパク質を有するΔ１５デサチュラーゼ活性を示すモチーフに対応するのに対し、配列番号２２４は真菌タンパク質を有するΔ１２デサチュラーゼ活性を示すモチーフに対応する。

【００４３】

配列番号２２５～２３８は、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）プロモーター領域を増幅するのに使用される、プライマーＹＬ２１１、ＹＬ２１２、ＹＬ３７６、ＹＬ３７７、ＹＬ２０３、ＹＬ２０４、ＧＰＡＴ－５－１、ＧＰＡＴ－５－２、ＯＤＭＷ３１４、ＹＬ３４１、ＯＤＭＷ３２０、ＯＤＭＷ３４１、２７２０３－Ｆ、および２７２０３－Ｒにそれぞれ対応する。

【００４４】

配列番号２３９～２４２はそれぞれ、リアルタイム分析のために使用されるオリゴヌクレオチドＹＬ－ＵＲＡ－１６Ｆ、ＹＬ－ＵＲＡ－７８Ｒ、ＧＵＳ－７６７Ｆ、およびＧＵＳ－８９１Ｒである。

【００４５】

配列番号２４３は、Ｗ４９７Ｌ突然変異を含んでなる突然変異ＡＨＡＳ遺伝子である。

【００４６】

配列番号２４４～２４９は、Ｗ４９７Ｌ突然変異を含んでなる突然変異ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＨＡＳ遺伝子の合成のために使用される４１０、４１１、４１２、４１３、４１４、および４１５にそれぞれ対応するプライマーである。

【００４７】

配列番号２５０～２８１は、合わせるとスラウストキトリウム・アウレウム（Ｔｈｒａｕｓｔｏｃｈｙｔｒｉｕｍ　ａｕｒｅｕｍ）Δ４デサチュラーゼのコドン最適化コード領域全体を含んでなる、１６対のオリゴヌクレオチドに対応する（すなわち、Ｄ４－１Ａ、Ｄ４－１Ｂ、Ｄ４－２Ａ、Ｄ４－２Ｂ、Ｄ４－３Ａ、Ｄ４－３Ｂ、Ｄ４－４Ａ、Ｄ４－４Ｂ、Ｄ４－５Ａ、Ｄ４－５Ｂ、Ｄ４－６Ａ、Ｄ４－６Ｂ、Ｄ４－７Ａ、Ｄ４－７Ｂ、Ｄ４－８Ａ、Ｄ４－８Ｂ、Ｄ４－９Ａ、Ｄ４－９Ｂ、Ｄ４－１０Ａ、Ｄ４－１０Ｂ、Ｄ４－１１Ａ、Ｄ４－１１Ｂ、Ｄ４－１２Ａ、Ｄ４－１２Ｂ、Ｄ４－１３Ａ、Ｄ４－１３Ｂ、Ｄ４－１４Ａ、Ｄ４－１４Ｂ、Ｄ４－１５Ａ、Ｄ４－１５Ｂ、Ｄ４－１６Ａ、およびＤ４－１６Ｂ）。

【００４８】

配列番号２８２～２８９は、コドン最適化Δ４デサチュラーゼ遺伝子合成中のＰＣＲ増幅のために使用される、プライマーＤ４－１Ｆ、Ｄ４－４Ｒ、Ｄ４－５Ｆ、Ｄ４－８Ｒ、Ｄ４－９Ｆ、Ｄ４－１２Ｒ、Ｄ４－１３、およびＤ４－１６Ｒにそれぞれ対応する。

【００４９】

配列番号２９０および２９１は、コドン最適化Δ４デサチュラーゼ遺伝子の合成中に使用される、プライマーＹＬ２５１およびＹＬ２５２にそれぞれ対応する。

【００５０】

配列番号２９２～３０７は、合わせるとＩ．ガルバナ（ｇａｌｂａｎａ）Δ９エロンガーゼのコドン最適化コード領域全体を含んでなる、８対のオリゴヌクレオチドに対応する（すなわちそれぞれＩＬ３－１Ａ、ＩＬ３－１Ｂ、ＩＬ３－２Ａ、ＩＬ３－２Ｂ、ＩＬ３－３Ａ、ＩＬ３－３Ｂ、ＩＬ３－４Ａ、ＩＬ３－４Ｂ、ＩＬ３－５Ａ、ＩＬ３－５Ｂ、ＩＬ３－６Ａ、ＩＬ３－６Ｂ、ＩＬ３－７Ａ、ＩＬ３－７Ｂ、ＩＬ３－８Ａ、およびＩＬ３－８Ｂ）。

【００５１】

配列番号３０８～３１１は、コドン最適化Δ９エロンガーゼ遺伝子合成中のＰＣＲ増幅のために使用される、プライマーＩＬ３－１Ｆ、ＩＬ３－４Ｒ、ＩＬ３－５Ｆ、およびＩＬ３－８Ｒにそれぞれ対応する。

【００５２】
配列番号３１２はｐＴ９（１－４）で記述される４１７ｂｐのＮｃｏＩ／ＰｓｔＩ断片であり、配列番号３１３はｐＴ９（５－８）で記述される３７７ｂｐのＰｓｔＩ／Ｎｏｔ１断片である。
【００５３】
配列番号３１４～３３９は、合わせるとコドンミドリムシ（Ｅ．ｇｒａｃｉｌｉｓ）Δ８デサチュラーゼの最適化コード領域全体を含んでなる１３対のオリゴヌクレオチドに対応する（すなわちそれぞれＤ８－１Ａ、Ｄ８－１Ｂ、Ｄ８－２Ａ、Ｄ８－２Ｂ、Ｄ８－３Ａ、Ｄ８－３Ｂ、Ｄ８－４Ａ、Ｄ８－４Ｂ、Ｄ８－５Ａ、Ｄ８－５Ｂ、Ｄ８－６Ａ、Ｄ８－６Ｂ、Ｄ８－７Ａ、Ｄ８－７Ｂ、Ｄ８－８Ａ、Ｄ８－８Ｂ、Ｄ８－９Ａ、Ｄ８－９Ｂ、Ｄ８－１０Ａ、Ｄ８－１０Ｂ、Ｄ８－１１Ａ、Ｄ８－１１Ｂ、Ｄ８－１２Ａ、Ｄ８－１２Ｂ、Ｄ８－１３Ａ、およびＤ８－１３Ｂ）。
【００５４】
配列番号３４０～３４７は、コドン最適化Δ８デサチュラーゼ遺伝子合成中のＰＣＲ増幅のために使用される、プライマーＤ８－１Ｆ、Ｄ８－３Ｒ、Ｄ８－４Ｆ、Ｄ８－６Ｒ、Ｄ８－７Ｆ、Ｄ８－９Ｒ、Ｄ８－１０Ｆ、およびＤ８－１３Ｒにそれぞれ対応する。
【００５５】
配列番号３４８はｐＴ８（１－３）で記述される３０９ｂｐのＮｃｏ／ＢｇＩＩＩ断片であり、配列番号３４９はｐＴ８（４－６）で記述される３２１ｂｐのＢｇＩＩＩ／ＸｈｏＩ断片であり、配列番号３５０はｐＴ８（７－９）で記述される２６４ｂｐのＸｈｏＩ／ＳａｃＩ断片であり、配列番号３５１は、ｐＴ８（１０－１３）で記述される３６９ｂｐのＳａｃ１／Ｎｏｔ１断片である。
【００５６】
配列番号３５２および３５３は、ｐＤＭＷ２５５中のＤ８Ｓ－２合成中に使用されるプライマーＯＤＭＷ３９０およびＯＤＭＷ３９１にそれぞれ対応する。
【００５７】
配列番号３５４および３５５は、実施例９で述べらるキメラＤ８Ｓ－１：：ＸＰＲおよびＤ８Ｓ－２：：ＸＰＲ遺伝子である。
【００５８】
配列番号３５６および３５７は、Ｄ８Ｓ－３合成中に使用されるプライマーＯＤＭＷ３９２およびＯＤＭＷ３９３に対応する。
【００５９】
配列番号３５８および３５９は、ミドリムシ（Ｅｕｇｌｅｎａ　ｇｒａｃｉｌｉｓ）からのΔ８デサチュラーゼ増幅のために使用される、プライマーＥｇ５－１およびＥｇ３－３にそれぞれ対応する。
【００６０】
配列番号３６０～３６３は、Δ８デサチュラーゼクローンの配列決定のために使用される、プライマーＴ７、Ｍ１３－２８Ｒｅｖ、Ｅｇ３－２、およびＥｇ５－２にそれぞれ対応する。
【００６１】
配列番号３６４は、Ｄ８Ｓ－３増幅のために使用されるプライマーＯＤＭＷ４０４に対応する。
【００６２】
配列番号３６５は、Ｄ８Ｓ－３を含んでなる１２７２ｂｐのキメラ遺伝子である。
【００６３】
配列番号３６６および３６７は、クローンされたＤ８Ｓ－３遺伝子中で新しい制限酵素部位作り出すのに使用される、プライマーＹＬ５２１およびＹＬ５２２にそれぞれ対応する。
【００６４】
配列番号３６８～３８１は、Ｄ８ＳＦを生成する部位特異的変異誘発反応で使用される

、プライマーＹＬ５２５、ＹＬ５２６、ＹＬ５２７、ＹＬ５２８、ＹＬ５２９、ＹＬ５３０、ＹＬ５３１、ＹＬ５３２、ＹＬ５３３、ＹＬ５３４、ＹＬ５３５、ＹＬ５３６、ＹＬ５３７、およびＹＬ５３８にそれぞれ対応する。

【００６５】

配列番号３８２は、Ｃｒｅリコンビナーゼ酵素によって認識されるＬｏｘＰ遺伝子組換え部位に対応する。

【００６６】

配列番号３８３および３８４は、プラスミドｐＹ８０の合成中にＧＰＤ：：Ｆｍ１：：ＸＰＲ２を増幅するのに使用される、プライマー４３６および４３７にそれぞれ対応する、

【００６７】

配列番号３８５～３８８は、二機能Δ５／Δ６デサチュラーゼをクローンするのに使用される、プライマー４７５、４７７、４７８、および４７６にそれぞれ対応する。

【００６８】

配列番号３８９および３９０は、部位特異的変異誘発によってプラスミドｐＹ９１ＭからプラスミドｐＹ９１Ｖを作り出すのに使用される、プライマー５０５および５０６にそれぞれ対応する。

【００６９】

配列番号３９１～３９３は、ＢＤクローンテック・クリエイター・スマート（ＢＤ－Ｃｌｏｎｔｅｃｈ　Ｃｒｅａｔｏｒ　Ｓｍａｒｔ）（登録商標）ｃＤＮＡライブラリーキットのプライマーである、スマート（ＳＭＡＲＴ）ＩＶオリゴヌクレオチド、ＣＤＳＩＩＩ／３’ＰＣＲプライマー、および５’－ＰＣＲプライマーにそれぞれ対応する。

【００７０】

配列番号３９４は、Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ｃＤＮＡライブラリー配列決定のために使用されるＭ１３順方向プライマーに対応する。

【００７１】

配列番号３９５～３９８および４００～４０１は、Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＬＰＡＡＴ２　ＯＲＦのクローニングのために使用される、プライマーＭＬＰＡＴ－Ｆ、ＭＬＰＡＴ－Ｒ、ＬＰＡＴ－Ｒｅ－５－１、ＬＰＡＴ－Ｒｅ－５－２、ＬＰＡＴ－Ｒｅ－３－１、およびＬＰＡＴ－Ｒｅ－３－２にそれぞれ対応する。

【００７２】

配列番号３９９および４０２は、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＬＰＡＡＴ１　ＯＲＦの５’（１１２９ｂｐ）および３’（９３８ｂｐ）領域にそれぞれ対応する。

【００７３】

配列番号４０３および４０４は、「対照」プラスミドｐＺＵＦ－ＭＯＤ－１を創生するのために使用される、プライマーｐｚｕｆ－ｍｏｄ１およびｐｚｕｆ－ｍｏｄ２にそれぞれ対応する。

【００７４】

配列番号４０５および４０６は、Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＤＧＡＴ１　ＯＲＦのクローニングのために使用される、プライマーＭＡＣＡＴ－Ｆ１およびＭＡＣＡＴ－Ｒにそれぞれ対応する。

【００７５】

配列番号４０７および４０８は、Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＤＧＡＴ２　ＯＲＦのクローニングのために使用される、プライマーＭＤＧＡＴ－ＦおよびＭＤＧＡＴ－Ｒ１にそれぞれ対応する。

【００７６】

配列番号４０９および４１０は、Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＧＰＡＴを増幅する縮重ＰＣＲのために使用される、プライマーＭＧＰＡＴ－Ｎ１およびＭＧＰＡＴ－ＮＲ５にそれぞれ対応する。

【００７７】
配列番号４１１～４１３は、Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＧＰＡＴの３’－末端増幅のために使用される、プライマーＭＧＰＡＴ－５Ｎ１、ＭＧＰＡＴ－５Ｎ２、およびＭＧＰＡＴ－５Ｎ３にそれぞれ対応する、
【００７８】
配列番号４１４および４１５は、クローンテック（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）のユニバーサルゲノムウォーカー^{TM}キットからのゲノム歩行のために使用されるゲノムウォーカーアダプターに対応する。
【００７９】
配列番号４１６～４１９は、ゲノム歩行で使用されるＰＣＲプライマーであるＭＧＰＡＴ－５－１Ａ、Ａｄａｐｔｏｒ－１（ＡＰ１）、ＭＧＰＡＴ－３Ｎ１、およびＮｅｓｔｅｄ　Ａｄａｐｔｏｒ　Ｐｒｉｍｅｒ　２（ＡＰ２）にそれぞれ対応する。
【００８０】
配列番号４２０および４２１は、Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＧＰＡＴを増幅するために使用される、プライマーｍｇｐａｔ－ｃｄｎａ－５およびｍｇｐａｔ－ｃｄｎａ－Ｒにそれぞれ対応する。
【００８１】
配列番号４２２および４２３は、Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＥＬＯ３の３’－末端領域を単離するゲノム歩行のために使用される、プライマーＭＡ　Ｅｌｏｎｇ　３’１およびＭＡ　ｅｌｏｎｇ　３’２にそれぞれ対応する。
【００８２】
配列番号４２４および４２５は、Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＥＬＯ３の５’－末端領域を単離するゲノム歩行のために使用される、プライマーＭＡ　Ｅｌｏｎｇ　５’１および４ＭＡ　Ｅｌｏｎｇ　５’２にそれぞれ対応する。
【００８３】
配列番号４２６および４２７は、Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ｃＤＮＡから完全なＥＬＯ３を増幅するために使用される、プライマーＭＡ　ＥＬＯＮＧ　５’　ＮｃｏＩ　３およびＭＡ　ＥＬＯＮＧ　３’ＮｏｔＩ１にそれぞれ対応する。
【００８４】
配列番号４２８および４２９は、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＹＥ２のコード領域を増幅するために使用される、プライマーＹＬ５９７およびＹＬ５９８にそれぞれ対応する。
【００８５】
配列番号４３０および４３１は、Ａｃｏ　３’ターミネーターを含有するＮｏｔＩ／ＰａｃＩ断片増幅するのに使用される、プライマーＹＬ３２５およびＹＬ３２６にそれぞれ対応する。
【００８６】
配列番号４３２～４３５は、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＹＥ１のコード領域を増幅するために使用される、プライマーＹＬ５６７、ＹＬ５６８、ＹＬ５６９、およびＹＬ５７０にそれぞれ対応する。
【００８７】
配列番号４３６および４３７は、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＹＥ１のクローニング中の部位特異的変異誘発のために使用される、プライマーＹＬ５７１およびＹＬ５７２にそれぞれ対応する。
【００８８】
配列番号４３８および４３９は、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＣＰＴ１ＯＲＦのクローニングのために使用される、プライマーＣＰＴ１－５’－ＮｃｏＩおよびＣＰＴ１－３’－ＮｏｔＩにそれぞれ対応する。
【００８９】
配列番号４４０および４４１は、Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）ＩＳＣ１

ＯＲＦのクローニングのために使用されるプライマーＩｓｃ１ＦおよびＩｓｃ１Ｒにそれぞれ対応する。

【００９０】

配列番号４４２および４４３は、Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）ＰＣＬ１ＯＲＦ．のクローニングのために使用される、プライマーＰｃｌ１ＦおよびＰｃｌ１Ｒにそれぞれ対応する。

【００９１】

配列番号４４４～４４７は、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＤＧＡＴ２遺伝子の標的を定めた中断のために使用される、プライマーＰ９５、Ｐ９６、Ｐ９７、およびＰ９８にそれぞれ対応する。

【００９２】

配列番号４４８～４５０は、中断されたＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＤＧＡＴ２遺伝子の標的を定めた組み込みをスクリーニングするのに使用される、プライマーＰ１１５、Ｐ１１６、およびＰ１１２にそれぞれ対応する。

【００９３】

配列番号４５１～４５４は、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＰＤＡＴ遺伝子の標的を定めた中断のために使用される、プライマーＰ３９、Ｐ４１、Ｐ４０、およびＰ４２にそれぞれ対応する。

【００９４】

配列番号４５５～４５８は、中断されたＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＰＤＡＴ遺伝子の標的を定めた組み込みをスクリーニングするのに使用される、プライマーＰ５１、Ｐ５２、Ｐ３７、およびＰ３８にそれぞれ対応する。

【００９５】

配列番号４５９および４６０は、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＤＧＡＴ１の単離のために使用される縮重プライマーであるＰ２０１およびＰ２０３としてそれぞれ同定される。

【００９６】

配列番号４６１～４６５は、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中の推定上のＤＧＡＴ１遺伝子の標的を定めた中断のためのターゲティングカセットの創生ために使用される、プライマーＰ２１４、Ｐ２１５、Ｐ２１６、Ｐ２１７、およびＰ２１９にそれぞれ対応する。

【００９７】

配列番号４６６および４６７は、中断されたＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＤＧＡＴ１遺伝子の標的を定めた組み込みをスクリーニングするのに使用される、プライマーＰ２２６およびＰ２２７にそれぞれ対応する。

【発明を実施するための最良の形態】

【００９８】

以下をはじめとする、本明細書で引用した全ての特許、特許出願、および公報は、引用することによりそれらの内容全体を組み込んだものとする。

米国特許出願第１０／８４０４７８号明細書（２００４年５月６日出願）、
米国特許出願第１０／８４０５７９号明細書（２００４年５月６日出願）、
米国特許出願第１０／８４０３２５号明細書（２００４年５月６日出願）、
米国特許出願第１０／８６９６３０号明細書（２００４年６月１６日出願）、
米国特許出願第１０／８８２７６０号明細書（２００４年７月１日出願）、
米国特許出願第１０／９８５１０９号明細書（２００４年１１月１０日出願）、
米国特許出願第１０／９８７５４８号明細書（２００４年１１月１２日出願）、
米国仮特許出願第６０／６２４８１２号明細書（２００４年１１月４日出願）、
米国特許出願第１１／０２４５４５号明細書および米国特許出願第１１／０２４５４４号明細書（２００４年１２月２９日出願）、
米国仮特許出願第６０／６８９０３１号明細書（２００５年６月９日出願）、

米国特許出願第１１／１８３６６４号明細書（２００５年７月１８日出願）、
米国特許出願第１１／１８５３０１号明細書（２００５年７月２０日出願）、
米国特許出願第１１／１９０７５０号明細書（２００５年７月２７日出願）、
米国特許出願第１１／２２５３５４号明細書（２００５年９月１３日出願）、
米国特許出願第１０／２５３，８８２号明細書（２００５年１０月１９日出願）、および
米国特許出願第１１／２５４，１７３号明細書（２００５年１０月１９日出願）。
米国特許出願第１０／８４０４７８号明細書（２００４年５月６日出願）、
米国特許出願第１０／８４０５７９号明細書（２００４年５月６日出願）、
米国特許出願第１０／８４０３２５号明細書（２００４年５月６日出願）、
米国特許出願第１０／８６９６３０号明細書（２００４年６月１６日出願）、
米国特許出願第１０／８８２７６０号明細書（２００４年７月１日出願）、
米国特許出願第１０／９８５１０９号明細書（２００４年１１月１０日出願）、
米国特許出願第１０／９８７５４８号明細書（２００４年１１月１２日出願）、
米国仮特許出願第６０／６２４８１２号明細書（２００４年１１月４日出願）、
米国特許出願第１１／０２４５４５号明細書および米国特許出願第１１／０２４５４４号明細書（２００４年１２月２９日出願）、
米国仮特許出願第６０／６８９０３１号明細書（２００５年６月９日出願）、
米国特許出願第１１／１８３６６４号明細書（２００５年７月１８日出願）、
米国特許出願第１１／１８５３０１号明細書（２００５年７月２０日出願）、
米国特許出願第１１／１９０７５０号明細書（２００５年７月２７日出願）、
米国特許出願第１１／２２５３５４号明細書（２００５年９月１３日出願）、
米国特許出願第１０／２５３，８８２号明細書（２００５年１０月１９日出願）
米国特許出願第１１／２５４，１７３号明細書（２００５年１０月１９日出願）
米国特許出願第１０／２５３，８８２号明細書（２００５年１０月１９日出願）
米国特許出願第１１／２５４，１７３号明細書（２００５年１０月１９日出願）

【００９９】

主題発明に従って、本出願人は、５％を超えるドコサヘキサエン酸（ＤＨＡ、２２：６、ω－３）を生成できるヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）生産宿主株を提供する。この特定の多価不飽和脂肪酸（ＰＵＦＡ）の蓄積は、高レベル組換えのために、発現油性酵母宿主にΔ６デサチュラーゼ、$C_{18/20}$エロンガーゼ、Δ５デサチュラーゼ、Δ１７デサチュラーゼ、$C_{20/22}$エロンガーゼ、およびΔ４デサチュラーゼ活性をコードするタンパク質を含んでなる機能性ω－３／ω－６脂肪酸生合成経路を導入して達成される。したがってこの開示は、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）を遺伝子操作して、ＤＨＡおよびその誘導体の商業生産を可能にできることを実証する。生成方法もまた特許請求される。

【０１００】

主題発明には多くの用途がある。ここで開示される方法によって作られるＰＵＦＡまたはその誘導体は、食餌代用物、または栄養補給剤、特に乳児用調製粉乳として、静脈内栄養補給を受ける患者のために、または栄養不良を防止または処置するために使用できる。代案としては、正常な使用において受容者が所望量の栄養補助を受け入れるように調合された調理油、脂肪またはマーガリン中に精製されたＰＵＦＡ（またはその誘導体）を組み込んでもよい。ＰＵＦＡはまた、乳児用調製粉乳、栄養補給剤またはその他の食品に組み込んでもよく、抗炎症薬またはコレステロール低下剤としての用途があるかもしれない。場合により組成物を薬学的用途（ヒトまたは獣医学）のために使用してもよい。この場合ＰＵＦＡは、一般に経口投与されるが、例えば非経口的（例えば皮下、筋肉内または静脈内）、経直腸、経膣、または局所的（例えば軟膏またはローション）など、それによってそれらが成功裏に吸収されるあらゆる経路によって投与できる。

【０１０１】

組換え手段によって生成されたＰＵＦＡをヒトまたは動物に補給することは、添加ＰＵＦＡレベルならびにそれらの代謝子孫の増大をもたらすことができる。例えばＤＨＡでの

処置は、ＤＨＡのレベル増大だけでなく、エイコサノイド（すなわちプロスタグランジン、ロイコトリエン、トロンボキサン）などのＤＨＡの下流生成物をもたらす。複雑な調節機序は、このような機序を防止、調節または克服して、個体中の特異的ＰＵＦＡの所望レベルを達成するために、様々なＰＵＦＡを組み合わせ、または異なるＰＵＦＡ抱合体を添加することを望ましくする。

【０１０２】

水産養殖飼料（すなわち乾燥飼料、半湿および湿潤飼料）は一般に栄養素組成物の少なくとも１～２％がω－３および／またはω－６ＰＵＦＡであることを必要とするので、代案の実施形態では、ここで開示される方法によって作られたＰＵＦＡ、またはその誘導体をこれらの調合物合成において利用できる。

【０１０３】

定義

本開示中では、いくつかの用語および略語を使用する。以下の定義が提供される。

【０１０４】

「読み取り枠」はＯＲＦと略記される。

【０１０５】

「ポリメラーゼ連鎖反応」はＰＣＲと略記される。

【０１０６】

「米国微生物系統保存機関」はＡＴＣＣと略記される。

【０１０７】

「多価不飽和脂肪酸」はＰＵＦＡと略記される。

【０１０８】

「ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ」はＤＡＧ　ＡＴまたはＤＧＡＴと略記される。

【０１０９】

「リン脂質：ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ」はＰＤＡＴと略記される。

【０１１０】

「グリセロール－３－リン酸アシルトランスフェラーゼ」はＧＰＡＴと略記される。

【０１１１】

「リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ」はＬＰＡＡＴと略記される。

【０１１２】

「アシル－ＣｏＡ：１－アシルリゾホスファチジルコリンアシルトランスフェラーゼ」は「ＬＰＣＡＴ」と略記される.

【０１１３】

「アシル－ＣｏＡ：ステロール－アシルトランスフェラーゼ」はＡＲＥ２と略記される。

【０１１４】

「ジアシルグリセロール」はＤＡＧと略記される。

【０１１５】

「トリアシルグリセロール」はＴＡＧと略記される。

【０１１６】

「Ｃｏ－酵素Ａ」はＣｏＡと略記される。

【０１１７】

「ホスファチジル－コリン」はＰＣと略記される。

【０１１８】

「フザリウム・モニリフォルメ（Ｆｕｓａｒｉｕｍ　ｍｏｎｉｌｉｆｏｒｍｅ）」という用語は「フザリウム・ベルチシリオイデス（Ｆｕｓａｒｉｕｍ　ｖｅｒｔｉｃｉｌｌｉｏｉｄｅｓ」と同義である。

【０１１９】

「食品」という用語は、一般にヒトの消費に適したあらゆる食物を指す。典型的な食品としては、肉製品、穀物製品、ベーカリー食品、スナック食品、乳製品などが挙げられるが、これに限定されるものではない。

【０１２０】

「機能性食品」という用語は、それが含有する伝統的栄養素を超えて健康上の利点を提供するかもしれないあらゆる変性食物または成分を含む、潜在的に健康的な製品を包含する食物を指す。機能性食品としては、ビタミン、ハーブ、および栄養補給食品で強化されたシリアル、パンなどの食物および飲料が挙げられる。機能性食品は、その栄養価を超えて健康上の利点を提供する物質を含有し、そこでは物質は食物中に自然に存在し、または意図的に添加される。

【０１２１】

ここでの用法では「メディカルフード」という用語は、医師の監督下で経腸的に消費または投与されるために調合され、医学的評価により広く認められている科学的原理に基づいて、独特の栄養要求性が確立されている疾患または病状の特異的食餌管理用である食物を指す［希少難病医薬法（２１　Ｕ．Ｓ．Ｃ．３６０ｅｅ（ｂ）（３））第５節（ｂ）を参照されたい］。食物は以下の場合に限り「メディカルフード」である。（ｉ）それが経口摂取またはチューブによる経腸栄養の手段による患者への部分的なまたは専用の給食のために、特別に調合され処理された製品である（その自然な状態で使用される天然由来食材とは対照的に）。（ｉｉ）それが治療的または慢性医療的必要性のために、通常の食材または特定の栄養素を経口摂取、消化、吸収、または代謝する能力が制限されたまたは損なわれた患者、またはその食餌管理が正常な食餌の修正のみでは達成できないその他の特別な医学的に判定された栄養要件を有する患者の食餌管理を対象とする。（ｉｉｉ）それが医学的評価によって判定された特異的疾患または症状から帰結する、ユニークな栄養要件の管理のために特に修正された栄養補給を提供する。（ｉｖ）それが医療的監督下で使用されることが意図される。および（ｖ）それがとりわけメディカルフードの使用指示に関して繰り返し医療的ケアを必要とする、積極的な継続中の医療的監督を受けている患者のみを対象とすることが意図される。したがって栄養補助食品または従来の食物とは異なり、独特の栄養要件が確立されている疾患または症状の特定の食餌管理を意図するメディカルフードは、特定疾患または症状のための独特の栄養補給の提供に関して科学的に妥当な効能書を有してもよい。メディカルフードは医学的監督の下で使用されるという要件によって、メディカルフードは、特別な食餌用途（例えば低アレルギー性食品）のためのより幅広いカテゴリーの食物、および健康機能をうたう食物（例えば栄養補助食品）とは区別される。

【０１２２】

「医学的栄養物」という用語は、ここで定義されるようなメディカルフードであり、典型的に特別な食餌要件のために特にデザインされた強化飲料を指す。医学的栄養物は、一般に特定の病状または食餌条件に焦点を合わせた食餌組成物を含んでなる。市販医学的栄養物の例としては、エンシュア（Ｅｎｓｕｒｅ）（登録商標）およびブースト（Ｂｏｏｓｔ）（登録商標）が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【０１２３】

「医薬品」という用語は、ここでの用法では、米国で販売される場合に米連邦食品医薬品化粧品法の第５０５または５０５条によって規制される化合物または物質を意味する。

【０１２４】

「乳児用調製粉乳」という用語は、それがヒト母乳をシミュレーションすると言う理由で、ヒト幼児による消費のためにだけデザインされた食物を意味する。典型的な乳児用調製粉乳の市販例としては、シミラック（Ｓｉｍｉｌａｃ）（登録商標）、およびイソミル（Ｉｓｏｍｉｌ）（登録商標）が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【０１２５】

「栄養補助食品」という用語は、次のような製品を指す。（ｉ）食餌に栄養補給することを意図し、したがって、従来の食物として、または食事または食餌の唯一のアイテムと

して使用されない。（ｉｉ）１つもしくはそれ以上の食餌成分（例えばビタミン、ミネラル、ハーブまたはその他の植物性薬品、アミノ酸、酵素、および腺エキスをはじめとする）またはそれらの構成要素を含有する。（ｉｉｉ）丸薬、カプセル、錠剤、または液体として経口摂取することが意図される。（ｉｖ）栄養補助食品としてラベル表示される。

【０１２６】

「食物類似物」とは、肉、チーズ、ミルクなどに関わらず、その食物対応物と似ているように製造された食物様製品であり、その対応物の外観、味、およびテクスチャを有することが意図される。したがって「食物」という用語は、ここでの用法では食物類似物もまた包含する。

【０１２７】

「水産養殖飼料」および「アクアフィード」という用語は、水産養殖産業において天然飼料を栄養補給するまたは置き換える人造または人工餌（配合飼料）を指す。したがってアクアフィードは、養殖魚および甲殻類（すなわちより安価な基本的食物魚種［例えばコイ、イズミダイ、およびナマズなどの淡水魚］および高級またはすき間市場用のより高価な換金産物種［例えば主にエビ、サケ、マス、ハマチ、スズキ、タイ、およびハタなどの海産および通し回遊種］の双方）に有用な人工的に配合された飼料を指す。これらの配合飼料は、互いに補完して、水産養殖種のために栄養的に完全な食餌を形成する様々な割合のいくつかの成分から構成される。

【０１２８】

「動物飼料」という用語は、家畜（ペット、農業家畜など）をはじめとする動物による消費、または例えば養魚業などの食物生産のために飼育される動物のみを意図した飼料を指す。

【０１２９】

「飼料栄養素」という用語は、本発明の組換え生産宿主を含んでなる酵母バイオマス由来であってもよい、タンパク質、脂質、炭水化物、ビタミン、ミネラル、および核酸などの栄養素を意味する。

【０１３０】

ここでの用法では「バイオマス」という用語は、商業的に顕著な量でＥＰＡを生成する組換え生産宿主の発酵からの使用済み酵母細胞物質を特に指す。

【０１３１】

「脂肪酸」という用語は、（より長い、およびより短い鎖長の酸の双方も知られているが）約C_{12}～C_{22}の様々な鎖長の長鎖脂肪族酸（アルカン酸）を指す。優勢な鎖長はC_{16}～C_{22}の間である。脂肪酸の構造は単純な表記法システム「Ｘ：Ｙ」によって表され、ここでＸは特定の脂肪酸中の炭素（Ｃ）原子の総数であり、Ｙは二重結合の数である。「飽和脂肪酸」対「不飽和脂肪酸」、「一不飽和脂肪酸」対「多価不飽和脂肪酸」（または「ＰＵＦＡ」）、および「オメガ－６脂肪酸」（ω－６またはｎ－６）」対「オメガ－３脂肪酸」（ω－３またはｎ－３）の違いについてさらに詳しくは、国際公開第２００４／１０１７５７号パンフレットで提供される。

【０１３２】

本開示においてＰＵＦＡを既述するのに使用される命名法を下の表３に示す。「略記法」と題された欄では、オメガ－参照システムが使用されて炭素数、二重結合数、およびオメガ炭素（この目的では番号１）から数えて、オメガ炭素に最も近い二重結合の位置を示唆する。表の残りは、ω－３およびω－６脂肪酸およびそれらの前駆物質の一般名、本願明細書全体で使用される略語、および各化合物の化学名を要約する。

【０１３３】

【表１０】

表3

多価不飽和脂肪酸および前駆物質の命名法

一般名	略語	化学名	略記法
ミリスチン酸	-	テトラデカン酸	14:0
パルミチン酸	Palmitate	ヘキサデカン酸	16:0
パルミトレイン酸	-	9-ヘキサデセン酸	16:1
ステアリン酸	-	オクタデカン酸	18:0
オレイン酸	-	シス-9-オクタデセン酸	18:1
リノール酸	LA	シス-9、12-オクタデカジエン酸	18:2ω-6
γ-リノール酸	GLA	シス-6、9、12-オクタデカトリエン酸	18:3ω-6
エイコサジエン酸	EDA	シス-11、14-エイコサジエン酸	20:2ω-6
ジホモ-γ-リノール酸	DGLA	シス-8、11、14-エイコサトリエン酸	20:3ω-6
アラキドン酸	ARA	シス-5、8、11、14-エイコサテトラエン酸	20:4ω-6
α-リノレン酸	ALA	シス-9,12,15-オクタデカトリエン酸	18:3ω-3
ステアリドン酸	STA	シス-6,9,12,15-オクタデカテトラエン酸	18:4ω-3
エイコサトリエン酸	ETrA	シス-11,14,17-エイコサトリエン酸	20:3ω-3
エイコサテトラエン酸	ETA	シス-8,11,14,17-エイコサテトラエン酸	20:4ω-3
エイコサペンタエン酸	EPA	シス-5,8,11,14,17-エイコサペンタエン酸	20:5ω-3
ドコサペンタエン酸	DPA	シス-7,10,13,16,19-ドコサペンタエン酸	22:5ω-3
ドコサヘキサエン酸	DHA	シス-4,7,10,13,16,19-ドコサヘキサエン酸	22:6ω-3

【０１３４】

「高レベルＥＰＡ生成」という用語は、微生物宿主の総脂質中に少なくとも約５％のＥＰＡ、好ましくは総脂質中の少なくとも約１０％のＥＰＡ、より好ましくは総脂質中の少なくとも約１５％のＥＰＡ、より好ましくは総脂質中の少なくとも約２０％のＥＰＡ、より好ましくは総脂質中の少なくとも約２５～３０％のＥＰＡ、より好ましくは総脂質中の少なくとも約３０～３５％のＥＰＡ、より好ましくは少なくとも約３５～４０％、そして最も好ましくは総脂質中の少なくとも約４０～５０％のＥＰＡの生成を指す。ＥＰＡの構造的な形態は限定されず、したがって例えばＥＰＡは総脂質中に遊離脂肪酸として、またはアシルグリセロール、リン脂質、スルホリピドまたは糖脂質などのエステル化形態で存在してもよい。

【０１３５】

「あらゆるＧＬＡを欠く」という用語は、約０．１％に至る検出可能レベルを有する機器を使用してＧＣ分析によって測定した場合における、微生物宿主の総脂質中のあらゆる検出可能なＧＬＡの欠如を指す。

【０１３６】

「必須脂肪酸」という用語は、生物が特定の必須脂肪酸を新規に（ｄｅ　ｎｏｖｏ）合成できず、生きるために経口摂取しなくてはならならない特定のＰＵＦＡを指す。例えば

哺乳類は、必須脂肪酸ＬＡ（１８：２、ω－６）およびＡＬＡ（１８：３、ω－３）を合成できない。その他の必須脂肪酸としては、ＧＬＡ（ω－６）、ＤＧＬＡ（ω－６）、ＡＲＡ（ω－６）、ＥＰＡ（ω－３）、およびＤＨＡ（ω－３）が挙げられる。

【０１３７】

「微生物油」または「単細胞油」は、微生物（例えば藻類、油性酵母菌、および糸状菌）によって、それらの生涯において天然に生成される油である。「油」という用語は、２５℃で液体であり、通常多価不飽和脂質である脂質物質を指す。対照的に「脂肪」という用語は、２５℃で固形物であり、通常飽和である脂質物質を指す。

【０１３８】

「リピッドボディ」とは、通常、特定のタンパク質およびリン脂質単層に結合する脂肪滴を指す。これらの細胞小器官は、ほとんどの生物が中性脂質を輸送／貯蔵する部位である。リピッドボディは、ＴＡＧ－生合成酵素を含有する小胞体のミクロドメインから発生すると考えられ、それらの合成およびサイズは、特定のタンパク質構成要素によって調節されているように見える。

【０１３９】

「中性脂質」とは、貯蔵脂肪および油として一般にリピッドボディの細胞に見られる脂質を指し、細胞ｐＨでは脂質が荷電群を有さないことからこう呼ばれる。一般にこれらは完全に非極性で水に対する親和性がない。中性脂質とは、一般に脂肪酸とグリセロールのモノ－、ジ－、および／またはトリエステルを指し、それぞれモノアシルグリセロール、ジアシルグリセロールまたはＴＡＧ（または集合的にアシルグリセロール）とも称される。アシルグリセロールから遊離脂肪酸を放出するためには、加水分解反応が起きなくてはならない。

【０１４０】

「トリアシルグリセロール」、「油」、および「ＴＡＧ」という用語は、グリセロール分子とエステル化する３個の脂肪酸アシル残基から構成される中性脂質を指す（そしてこのような用語は、本開示の全体を通して区別なく使用される）。このような油は、長鎖ＰＵＦＡ、ならびにより短い飽和および不飽和脂肪酸、および鎖長のより長い飽和脂肪酸を含有できる。したがって「油生合成」は、一般に細胞におけるＴＡＧ合成を指す。

【０１４１】

「アシルトランスフェラーゼ」という用語は、アミノ－アシル基（ＥＣ２．３．１．－）以外の基の転移に関与する酵素を指す。

【０１４２】

「ＤＡＧ　ＡＴ」という用語は、ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ（アシル－ＣｏＡ－ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼまたはジアシルグリセロール－Ｏ－アシルトランスフェラーゼとしても知られる）（ＥＣ２．３．１．２０）を指す。この酵素は、アシル－ＣｏＡおよび１，２－ジアシルグリセロールからＴＡＧおよびＣｏＡへの変換に関与する（したがってＴＡＧ生合成の最終段階に関与する）。ＤＧＡＴ１およびＤＧＡＴ２の２つのＤＡＧ　ＡＴ酵素ファミリーが存在する。前者のファミリーはアシル－ＣｏＡ：コレステロールアシルトランスフェラーゼ（ＡＣＡＴ）遺伝子ファミリーと類似しており、後者のファミリーは関連性がない（ラルディサバル（Ｌａｒｄｉｚａｂａｌ）ら著、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７６（４２）：３８８６２～３８８６９頁（２００１年））。

【０１４３】

「ＰＤＡＴ」という用語は、リン脂質：ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ酵素（ＥＣ２．３．１．１５８）を指す。この酵素は、リン脂質のｓｎ－２位から１，２－ジアシルグリセロールのｓｎ－３位へのアシル基転移に関与し、その結果リゾリン脂質およびＴＡＧが得られる（したがってＴＡＧ生合成の最終段階に関与する）。この酵素はアシル－ＣｏＡ－非依存性機序を通じてＴＡＧを合成することで、ＤＧＡＴ（ＥＣ２．３．１．２０）とは異なる。

【０１４４】

「ＡＲＥ２」という用語は、アシル－ＣｏＡ＋ステロール＝ＣｏＡ＋ステロールエステルの反応を触媒するアシル－ＣｏＡ：ステロール－アシルトランスフェラーゼ酵素を指す（ＥＣ２．３．１．２６、ステロール－エステルシンターゼ２酵素としてもまた知られている）。

【０１４５】

「ＧＰＡＴ」という用語は、ｇｐａｔ遺伝子によってコードされ、アシル－ＣｏＡおよびｓｎ－グリセロール３－リン酸をＣｏＡおよび１－アシル－ｓｎ－グリセロール３－リン酸に変換する（リン脂質生合成の第１のステップ）グリセロール－３－リン酸－Ｏ－アシルトランスフェラーゼ酵素（Ｅ．Ｃ．２．３．１．１５）を指す。

【０１４６】

「ＬＰＡＡＴ」という用語は、リゾホスファチジン酸－アシルトランスフェラーゼ酵素（ＥＣ２．３．１．５１）を指す。この酵素は、ＣｏＡおよび１，２－ジアシル－ｓｎ－グリセロール３－リン酸（ホスファチジン酸）を生成する、１－アシル－ｓｎ－グリセロール３－リン酸（すなわちリゾホスファチジン酸）上へのアシル－ＣｏＡ基の転移に関与する。文献はまた、アシル－ＣｏＡ：１－アシル－ｓｎ－グリセロール－３－リン酸２－Ｏ－アシルトランスフェラーゼ、１－アシル－ｓｎ－グリセロール－３－リン酸アシルトランスフェラーゼおよび／または１－アシルグリセロールリン酸アシルトランスフェラーゼ（ＡＧＡＴと略記される）としてのＬＰＡＡＴについても言及する。

【０１４７】

「ＬＰＣＡＴ」という用語は、アシル－ＣｏＡ：１－アシルリゾホスファチジル－コリンアシルトランスフェラーゼを指す。この酵素は、ＣｏＡとホスファチジルコリン（ＰＣ）間のアシル基交換に関与する。ここではそれはまた、ＣｏＡとリゾホスファチジン酸（ＬＰＡ）をはじめとするその他のリン脂質間のアシル交換に関与する酵素も指す。

【０１４８】

「総脂質および油画分中のパーセント（％）ＰＵＦＡ」とは、これらの画分中の全脂肪酸に対するＰＵＦＡのパーセントを指す。「全脂質画分」または「脂質画分」という用語は、どちらも油性生物中の全脂質（すなわち中性および極性）の合計を指すので、ホスファチジルコリン（ＰＣ）画分、ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥ）画分、およびトリアシルグリセロール（ＴＡＧまたは油）画分内に位置する脂質を含む。しかし「脂質」および「油」という用語は、本願明細書全体で同義的に使用される。

【０１４９】

「ホスファチジルコリン」または「ＰＣ」という用語は、細胞膜の主要構成要素であるリン脂質を指す。ＰＣの化学構造は、一般にコリン分子、リン酸基、およびグリセロールを含んでなるとして記述でき、そこでは脂肪酸アシル鎖がＲ基として、グリセロール分子のｓｎ－１およびｓｎ－２位上に付着する。

【０１５０】

「ＰＵＦＡ生合成経路酵素」と言う用語は、Δ４デサチュラーゼ、Δ５デサチュラーゼ、Δ６デサチュラーゼ、Δ１２デサチュラーゼ、Δ１５デサチュラーゼ、Δ１７デサチュラーゼ、Δ９デサチュラーゼ、Δ８デサチュラーゼ、Δ９エロンガーゼ、$C_{14/16}$エロンガーゼ、$C_{16/18}$エロンガーゼ、$C_{18/20}$エロンガーゼおよび／または$C_{20/22}$エロンガーゼをはじめとする、ＰＵＦＡの生合成に関連する酵素（および前記酵素をコードする遺伝子）のいずれかを指す。「ω－３／ω－６脂肪酸生合成経路」という用語は、適切な条件下で発現されると、ω－３およびω－６脂肪酸のいずれかまたは双方の生成を触媒する酵素をコードする一組の遺伝子を指す。典型的にω－３／ω－６脂肪酸生合成経路に関与する遺伝子は、以下の酵素のいくつかまたは全てをコードする。Δ１２デサチュラーゼ、Δ６デサチュラーゼ、$C_{18/20}$エロンガーゼ、$C_{20/22}$エロンガーゼ、Δ９エロンガーゼ、Δ５デサチュラーゼ、Δ１７デサチュラーゼ、Δ１５デサチュラーゼ、Δ９デサチュラーゼ、、およびΔ４デサチュラーゼ。代表的な経路は図１に示され、様々な中間体を経由するオレイン酸のＤＨＡへの変換が提供され、ω－３およびω－６脂肪酸の双方が、共通の原料からどのように生成されてもよいかを実証する。経路は

自然に２つの部分に別れ、１つの部分はω－３脂肪酸、別の部分はω－６脂肪酸のみを発生させる。ω－３脂肪酸のみを発生させる部分をここでω－３脂肪酸生合成経路と称するのに対し、ω－６脂肪酸のみを発生させる部分はここでω－６脂肪酸生合成経路と称する。

【０１５１】

「機能性」という用語は、ここでω－３／ω－６脂肪酸生合成経路に関する文脈で、経路中の遺伝子のいくつか（または全て）が、活性酵素を発現し、生体内（ｉｎ　ｖｉｖｏ）触媒作用または基質変換をもたらすことを意味する。いくつかの脂肪酸生成物は、この経路の遺伝子のサブセットの発現のみを必要とするので、「ω－３／ω－６脂肪酸生合成経路」または「機能性ω－３／ω－６脂肪酸生合成経路」は、上の段落で列挙される全遺伝子が必要とされることを暗示しないものとする。

【０１５２】

「ω－６Δ６デサチュラーゼ／Δ６エロンガーゼ経路」という用語は、次の遺伝子を最低限含むＤＨＡ脂肪酸生合成経路を指す。Δ６デサチュラーゼ、$C_{18/20}$エロンガーゼ、Δ５デサチュラーゼ、Δ１７デサチュラーゼ、$C_{20/22}$エロンガーゼ、およびΔ４デサチュラーゼ。「ω－３Δ６デサチュラーゼ／Δ６エロンガーゼ経路」という用語は、次の遺伝子を最低限含むＤＨＡ脂肪酸生合成経路を指す。Δ１５デサチュラーゼ、Δ６デサチュラーゼ、$C_{18/20}$エロンガーゼ、Δ５デサチュラーゼ、$C_{20/22}$エロンガーゼ、およびΔ４デサチュラーゼ。「連結Δ６デサチュラーゼ／Δ６エロンガーゼ経路」という用語は、最低限次の遺伝子を含むＤＨＡ脂肪酸生合成経路を指す。Δ１５デサチュラーゼ、Δ６デサチュラーゼ、$C_{18/20}$エロンガーゼ、Δ５デサチュラーゼ、Δ１７デサチュラーゼ、$C_{20/22}$エロンガーゼ、およびΔ４デサチュラーゼ。最後に「Δ６デサチュラーゼ／Δ６エロンガーゼ経路」という用語は、上述のあらゆるΔ６デサチュラーゼ／Δ６エロンガーゼ経路の１つもしくはそれ以上を総称的に指す。

【０１５３】

同様に、「ω－６Δ９エロンガーゼ／Δ８デサチュラーゼ経路」という用語は、次の遺伝子を最低限含むＤＨＡ脂肪酸生合成経路を指す。Δ９エロンガーゼ、Δ８デサチュラーゼ、Δ５デサチュラーゼ、Δ１７デサチュラーゼ、$C_{20/22}$エロンガーゼ、およびΔ４デサチュラーゼ。「ω－３Δ９エロンガーゼ／Δ８デサチュラーゼ経路」という用語は、次の遺伝子を最低限含むＤＨＡ脂肪酸生合成経路を指す。Δ１５デサチュラーゼ、Δ９エロンガーゼ、Δ８デサチュラーゼ、Δ５デサチュラーゼ、$C_{20/22}$エロンガーゼ、およびΔ４デサチュラーゼ。「連結Δ９エロンガーゼ／Δ８デサチュラーゼ経路」という用語は、次の遺伝子を最低限含むＤＨＡ脂肪酸生合成経路を指す。Δ１５デサチュラーゼ、Δ９エロンガーゼ、Δ８デサチュラーゼ、Δ５デサチュラーゼ、Δ１７デサチュラーゼ、$C_{20/22}$エロンガーゼ、およびΔ４デサチュラーゼ。そして「Δ９エロンガーゼ／Δ８デサチュラーゼ経路」という用語は、あらゆる上述のΔ９エロンガーゼ／Δ８デサチュラーゼ経路の１つもしくはそれ以上を総称的にを指す。

【０１５４】

「デサチュラーゼ」と言う用語は、不飽和化できる、すなわち１個もしくはそれ以上の脂肪酸に二重結合を導入して、興味のある脂肪酸または前駆物質を生じさせるポリペプチドを指す。特定の脂肪酸を指すために、本願明細書全体を通じてω参照システムを使用するのにもかかわらず、Δシステムを使用して基質のカルボキシル末端から数えることで、デサチュラーゼの活性を示す方が都合よい。ここで特に関心が高いのは、１．）分子のカルボキシル末端から数えて８および９番めの炭素原子間で脂肪酸を不飽和化し、例えばＥＤＡからＤＧＬＡへのおよび／またはＥＴｒＡからＥＴＡへの変換を触媒するΔ８デサチュラーゼ、２．）ＬＡからＧＬＡへのおよび／またはＡＬＡからＳＴＡへの変換を触媒するΔ６デサチュラーゼ、３．）ＤＧＬＡからＡＲＡへのおよび／またはＥＴＡからＥＰＡへの変換を触媒するΔ５デサチュラーゼ、４．）ＤＰＡからＤＨＡへの変換を触媒するΔ４デサチュラーゼ、５．）オレイン酸からＬＡへの変換を触媒するΔ１２デサチュラーゼ、６．）ＬＡからＡＬＡへのおよび／またはＧＬＡからＳＴＡへの変換を触媒するΔ１５

デサチュラーゼ、７．）ＡＲＡらＥＰＡへのおよび／またはＤＧＬＡからＥＴＡへの変換を触媒するΔ１７デサチュラーゼ、および８．）パルミチン酸からパルミトレイン酸（１６：１）および／またはステアリン酸からオレイン酸（１８：１）への変換を触媒するΔ９デサチュラーゼである。

【０１５５】

本発明のΔ１５デサチュラーゼに言及する「二機能」という用語は、ポリペプチドが酵素基質として、オレイン酸およびＬＡの双方を使用する能力を有することを意味する。同様に本発明のΔ５デサチュラーゼに言及する「二機能」という用語は、ポリペプチドが以下を使用する能力を有することを意味する。（１）ＤＧＬＡおよびＥＴＡよりなる群から選択される少なくとも１つの酵素基質、および（２）ＬＡおよびＡＬＡよりなる群から選択される少なくとも１つの酵素基質。「酵素基質」とは、ポリペプチドが活性部位で基質に結合し、反応性様式でそれに作用することを意味する。

【０１５６】

「エロンガーゼ系」と言う用語は、エロンガーゼ系が作用する脂肪酸基質よりも炭素２個分長い酸を生成する、脂肪酸炭素鎖の伸長に関与する４つの酵素の一揃いを指す。より具体的にはこの延長プロセスは、ＣｏＡがアシルキャリアである脂肪酸合成酵素と共同して起きる（ラスナー（Ｌａｓｓｎｅｒ）ら著、Ｔｈｅ　Ｐｌａｎｔ　Ｃｅｌｌ　８：２８１～２９２頁（１９９６年））。基質特異性であり、また律速でもあることが分かった第１のステップでは、マロニル－ＣｏＡが長鎖アシル－ＣｏＡと縮合して、CO_2およびβ－ケトアシル－ＣｏＡを生じる（アシル部分が炭素原子２個分伸長される）。引き続く反応には、β－ヒドロキシアシル－ＣｏＡへの還元、エノイル－ＣｏＡへの脱水、および伸長されたアシル－ＣｏＡを生じる第２の還元が含まれる。エロンガーゼ系によって触媒される反応の例は、ＧＬＡからＤＧＬＡ、ＳＴＡからＥＴＡ、およびＥＰＡからＤＰＡへの変換である。

【０１５７】

ここでの目的では、第１の縮合反応（すなわちマロニル－ＣｏＡのβ－ケトアシル－ＣｏＡへの変換）を触媒する酵素を総称的に「エロンガーゼ」と称する。一般にエロンガーゼの基質選択性はいくぶん幅広いが、鎖長および不飽和の程度およびタイプの双方によって区別する。したがってエロンガーゼは異なる特異性を有することができる。例えば$C_{14/16}$エロンガーゼは、C_{14}基質（例えばミリスチン酸）を利用し、$C_{16/18}$エロンガーゼはC_{16}基質（例えばパルミチン酸）を利用し、$C_{18/20}$エロンガーゼはC_{18}基質（例えばＧＬＡ、ＳＴＡ）を利用し、$C_{20/22}$エロンガーゼはC_{20}基質（例えばＥＰＡ）を利用する。同様にΔ９エロンガーゼは、ＬＡおよびＡＬＡからＥＤＡおよびＥＴｒＡへの変換をそれぞれ触媒できる。いくつかのエロンガーゼは幅広い特異性を有するため、単一酵素がいくつかのエロンガーゼ反応を触媒できるかもしれない（それによって例えば$C_{16/18}$エロンガーゼおよび$C_{18/20}$エロンガーゼの双方として作用する）ことに留意することは重要である。好ましい実施形態では、適切な宿主を脂肪酸エロンガーゼの遺伝子で形質転換して、宿主の脂肪酸プロフィールに対するその効果を判定し、脂肪酸エロンガーゼの特異性を経験的に判定することが最も望ましい。

【０１５８】

「高親和力エロンガーゼ」または「ＥＬ１Ｓ」または「ＥＬＯ１」という用語は、その基質特異性が好ましくはＧＬＡに対するものである$C_{18/20}$エロンガーゼを指す（エロンガーゼ反応の生成物がＤＧＬＡ［すなわちΔ６エロンガーゼ］）。このようなエロンガーゼの１つについては、国際公開第００／１２７２０号パンフレットで述べられ、ここで配列番号２２および２３として提供される。しかし出願者らはこの酵素がまた、１８：２（ＬＡ）および１８：３（ＡＬＡ）に対してもいくらかの活性を有することを示した。したがって配列番号２３は、（そのΔ６エロンガーゼ活性に加えて）Δ９エロンガーゼ活性を示す。したがってここで配列番号２３として提供される$C_{18/20}$エロンガーゼは、本発明で述べられるようにΔ６デサチュラーゼ／Δ６エロンガーゼ経路内の双方で機能し、そして例えばイソクリシス・ガルバナ（Ｉｓｏｃｈｒｙｓｉｓ　ｇａｌｂａｎａ）Δ

９エロンガーゼ（配列番号７０）の代わりとして、Δ９エロンガーゼ／Δ８デサチュラーゼ経路内で機能できると結論された。

【０１５９】

「ＥＬ２Ｓ」または「ＥＬＯ２」という用語は、その基質特異性が、好ましくはＧＬＡに対するもの（エロンガーゼ反応の生成物がＤＧＬＡ）および／またはＳＴＡ（エロンガーゼ反応の生成物がＳＴＡ）に対するものであるＣ$_{18/20}$エロンガーゼを指す。このような１つのエロンガーゼについては、米国特許第６，６７７，１４５号明細書で述べられ、ここで配列番号２５および２６として提供される。

【０１６０】

「ＥＬＯ３」という用語は、ｅｌｏ３遺伝子（配列番号８６）によってコードされるモルティエラ・アルピナ（Ｍｏｒｔｉｅｒｅｌｌａ　ａｌｐｉｎａ）Ｃ$_{16/18}$脂肪酸エロンガーゼ酵素（ここで配列番号８７として提供される）を指す。「ＹＥ２」という用語は、ここで配列番号９４として提供される遺伝子によってコードされる、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）Ｃ$_{16/18}$脂肪酸エロンガーゼ酵素（ここで配列番号９５として提供される）を指す。ここで報告されるデータに基づいて、ＥＬＯ３およびＹＥ２は、どちらもパルミチン酸（１６：０）からステアリン酸（１８：０）への変換を優先的に触媒する。

【０１６１】

「ＹＥ１」という用語は、ここで配列番号９７として提供される遺伝子によってコードされる、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）Ｃ$_{14/16}$脂肪酸エロンガーゼ酵素（ここで配列番号９８として提供される）を指す。ここで報告されるデータに基づいて、ＹＥ２はミリスチン酸（１４：０）のパルミチン酸（１６：０）への変換を優先的に触媒する。

【０１６２】

「変換効率」および「％基質変換」という用語は、それによって特定の酵素（例えばデサチュラーゼまたはエロンガーゼ）が基質を生成物に変換できる効率を指す。変換効率は以下の式に従って評価される。（［生成物］／［基質＋生成物］）×１００（式中、「生成物」には、直接生成物およびそれから誘導される経路中の全生成物が含まれる）。

【０１６３】

「油性」と言う用語は、それらのエネルギー源を脂質の形態で保存する傾向がある生物を指す（ウィーテ（Ｗｅｅｔｅ）著、「真菌脂質生化学（Ｆｕｎｇａｌ　Ｌｉｐｉｄ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ）」第２版、Ｐｌｅｎｕｍ、１９８０年）。一般にこれらの微生物細胞の油含量はＳ字形曲線に従い、対数増殖後期または定常増殖初期において脂質濃度が最大に達するまで増大し、次に定常増殖後期および死滅期において徐々に減少する（ヨンマニットチャイ（Ｙｏｎｇｍａｎｉｔｃｈａｉ）およびワード（Ｗａｒｄ）著、Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．５７：４１９～２５頁（１９９１年））。

【０１６４】

「油性酵母菌」と言う用語は、油を生成できる酵母菌として分類される微生物を指す。一般に油性微生物の細胞油またはトリアシルグリセロール含量はＳ字形曲線に従い、脂質濃度は対数増殖後期または定常増殖初期において最大に達するまで増大し、次に定常増殖後期および死滅期において徐々に減少する（ヨンマニットチャイ（Ｙｏｎｇｍａｎｉｔｃｈａｉ）およびワード（Ｗａｒｄ）著、Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．５７：４１９～２５頁（１９９１年））。油性微生物が約２５％を超えるその乾燥細胞重量を油として蓄積するのは珍しくない。油性酵母菌の例としては、ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）、カンジダ（Ｃａｎｄｉｄａ）、ロドトルラ（Ｒｈｏｄｏｔｏｒｕｌａ）、ロドスポリジウム（Ｒｈｏｄｏｓｐｏｒｉｄｉｕｍ）、クリプトコッカス（Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）、トリコスポロン（Ｔｒｉｃｈｏｓｐｏｒｏｎ）、およびリポマイセス（Ｌｉｐｏｍｙｃｅｓ）属が挙げられるが、決してこれに限定されるものではない。

【０１６５】

「発酵性炭素源」と言う用語は、微生物が代謝してエネルギーを引き出す炭素源を意味

する。本発明の典型的な炭素源としては、単糖類、少糖類、多糖類、アルカン、脂肪酸、脂肪酸エステル、モノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリド、二酸化炭素、メタノール、ホルムアルデヒド、ギ酸、および炭素含有アミンが挙げられるが、これに限定されるものではない。

【０１６６】

ここでの用法では、「単離された核酸断片」は、場合により合成、非天然または修飾ヌクレオチド塩基を含有する一本鎖または二本鎖であるＲＮＡまたはＤＮＡのポリマーを意味する。ＤＮＡポリマーの形態の単離された核酸断片は、１個またはそれ以上のｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡまたは合成ＤＮＡの断片を含んでなってもよい。

【０１６７】

アミノ酸またはヌクレオチド配列の「かなりの部分」とは、当業者による配列の手動評価によって、あるいはＢＬＡＳＴ（「基礎的局在性配列検索ツール（Ｂａｓｉｃ　Ｌｏｃａｌ　Ａｌｉｇｎｍａｎｔ　Ｓｅａｒｃｈ　Ｔｏｏｌ）」アルトシュール（Ａｌｔｓｃｈｕｌ），Ｓ．Ｆ．ら著、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３～４１０頁（１９９３年））などのアルゴリズムを使用したコンピュータ自動化アラインメントおよび同定によって、遺伝子またはポリペプチドの推定上の同定を得るのに十分なポリペプチドのアミノ酸配列または遺伝子のヌクレオチド配列を含んでなる部分である。推定的にポリペプチドまたは核酸配列が既知のタンパク質または遺伝子に相同的であると同定するためには、一般に１０個以上の隣接するアミノ酸または３０個以上のヌクレオチド配列が必要である。さらにヌクレオチド配列に関して、２０～３０個の隣接するヌクレオチドを含んでなる遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプローブを配列依存遺伝子同定法（例えばサザンハイブリダイゼーション）および単離（例えば細菌コロニーまたはバクテリオファージ・プラークの原位置（ｉｎ　ｓｉｔｕ）ハイブリダイゼーション）において使用してもよい。さらにプライマーを含んでなる特定の核酸断片を得るために、塩基１２～１５個の短いオリゴヌクレオチドを増幅プライマーとしてＰＣＲで使用してもよい。したがってヌクレオチド配列の「かなりの部分」は、配列を含んでなる核酸断片を特異的に同定および／または単離できるようにする十分な配列を含んでなる。

【０１６８】

「相補的」と言う用語は、互いにハイブリダイズできるヌクレオチド塩基間の関係について述べるために使用される。例えばＤＮＡについて、アデノシンはチミンに相補的であり、シトシンはグアニンに相補的である。

【０１６９】

「コドン縮重」とは、コードされるポリペプチドのアミノ酸配列に影響することなく、ヌクレオチド配列の変更を可能にする遺伝コードにおける性質を指す。当業者は、任意のアミノ酸を特定化するためのヌクレオチドコドンの利用において、特定の宿主細胞によって示される「コドンバイアス」を十分承知している。したがって宿主細胞中における改善された発現のために遺伝子を合成する場合、コドン使用頻度が宿主細胞の好ましいコドン使用頻度に近くなるようように、遺伝子をデザインすることが望ましい。

【０１７０】

「化学的に合成された」とは、ＤＮＡ配列に関連して構成要素ヌクレオチドが、生体外で（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）構築されたことを意味する。確立した手順を使用してＤＮＡの手動化学合成を達成してもよく、あるいはいくつかの市販の機器の１つを使用して自動化学合成を実施できる。「合成遺伝子」は、当業者に知られた手順を使用して化学的に合成されるオリゴヌクレオチド構成単位から構築できる。これらの構成単位をライゲートしアニールして遺伝子セグメントを形成し、次にそれを酵素的にアセンブルして遺伝子全体を構成する。したがってヌクレオチド配列の最適化に基づいて、最適な遺伝子発現のために遺伝子を調整し、宿主細胞のコドンバイアスを反映させることができる。当業者は、コドン利用が宿主によって好まれるコドンに偏っている場合の遺伝子発現成功の見込みを理解する。好ましいコドンの判定は、配列情報が利用できる宿主細胞から誘導された遺伝子の調査に基づくことができる。

【０１７１】
「遺伝子」とは特定のタンパク質を発現する核酸断片を指し、それはコード領域を単独で指してもよく、またはコード配列に先行する（５’非コード配列）およびそれに続く（３’非コード配列）制御配列を含んでもよい。「天然遺伝子」とは、自然界にそれ自体の制御配列と共に見られる遺伝子を指す。「キメラ遺伝子」とは、自然界に共に見られない制御およびコード配列を含んでなる天然遺伝子でないあらゆる遺伝子を指す。したがってキメラ遺伝子は、異なる供給源から誘導される制御配列およびコード配列、あるいは同一供給源から誘導されるが、自然界に見られるのとは異なるやり方で配列する制御配列およびコード配列を含んでなってもよい。「内在性遺伝子」とは、生物ゲノムにおいてその天然位置にある天然遺伝子を指す。「外来性」遺伝子とは、遺伝子移入によって宿主生物に導入される遺伝子を指す。外来性遺伝子は、非天然生物に挿入された天然遺伝子、天然宿主内の新しい位置に導入された天然遺伝子、あるいはキメラ遺伝子を含んでなることができる。「導入遺伝子」とは、形質転換手順によってゲノム中に導入された遺伝子である。「コドン最適化遺伝子」とは、そのコドン使用頻度が宿主細胞の好むコドン使用頻度を模倣するようにデザインされた遺伝子である。

【０１７２】
「コード配列」とは、特定のアミノ酸配列をコードするＤＮＡ配列を指す。「適切な制御配列」とは、コード配列の上流（５’非コード配列）、配列内、または下流（３’非コード配列）に位置して、転写、ＲＮＡプロセシングまたは安定性、または関連コード配列の翻訳に影響を及ぼすヌクレオチド配列を指す。制御配列は、プロモーター、翻訳リーダー配列、イントロン、ポリアデニル化認識配列、ＲＮＡプロセッシング部位、エフェクター結合部位、およびステムーループ構造を含んでもよい。

【０１７３】
「プロモーター」とは、コード配列または機能性ＲＮＡの発現を調節できるＤＮＡ配列を指す。一般にコード配列は、プロモーター配列に対して３’に位置する。プロモーターは、そっくりそのまま天然遺伝子から誘導されてもよく、あるいは自然界に見られる異なるプロモーターから誘導される異なる要素からなってもよく、あるいは合成ＤＮＡセグメントを含んでなってもよい。異なるプロモーターは、異なる組織または細胞タイプ中で、あるいは異なる開発段階において、あるいは異なる環境または生理学的条件に呼応して、遺伝子の発現を導いてもよいことが当業者には理解される。ほとんどの細胞タイプ中でほとんどの場合に遺伝子の発現を引き起こすプロモーターは、一般に「構成的プロモーター」と称される。ほとんどの場合、制御配列のはっきりした境界は完全に画定されていないので、異なる長さのＤＮＡ断片が同一のプロモーター活性を有してもよいこともさらに認識される。

【０１７４】
「ＧＰＡＴプロモーター」または「ＧＰＡＴプロモーター領域」という用語は、ｇｐａｔ遺伝子によってコードされるグリセロールー３ーリン酸ーＯーアシルトランスフェラーゼ酵素（Ｅ．Ｃ．２．３．１．１５）の「ＡＴＧ」翻訳開始コドンの前にあって、発現に必要である５’上流非翻訳領域を指す。適切なヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＧＰＡＴプロモーター領域の例については、米国特許出願第１１／２２５３５４号明細書で述べられる。

【０１７５】
「ＧＰＤプロモーター」または「ＧＰＤプロモーター領域」という用語は、ｇｐｄ遺伝子によってコードされるグリセルアルデヒドー３ーリン酸デヒドロゲナーゼ酵素（Ｅ．Ｃ．１．２．１．１２）の「ＡＴＧ」翻訳開始コドンの前にあって、発現に必要である５’上流非翻訳領域を指す。適切なヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＧＰＤプロモーター領域の例については、国際公開第２００５／００３３１０号パンフレットで述べられる。

【０１７６】
「ＧＰＭプロモーター」または「ＧＰＭプロモーター領域」という用語は、ｇｐｍ遺伝

子によってコードされるホスホグリセリン酸ムターゼ酵素（ＥＣ５．４．２．１）の「ＡＴＧ」翻訳開始コドンの前にあって、発現に必要である５’上流非翻訳領域を指す。適切なヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＧＰＭプロモーター領域の例については、国際公開第２００５／００３３１０号パンフレットで述べられる。

【０１７７】

「ＦＢＡプロモーター」または「ＦＢＡプロモーター領域」という用語は、ｆｂａ１遺伝子によってコードされるフルクトース－ビスリン酸アルドラーゼ酵素（Ｅ．Ｃ．４．１．２．１３）の「ＡＴＧ」翻訳開始コドンの前にあって、発現に必要である５’上流非翻訳領域を指す。適切なヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＦＢＡプロモーター領域の例については、国際公開第２００５／０４９８０５号パンフレットで述べられる。

【０１７８】

「ＦＢＡＩＮプロモーター」または「ＦＢＡＩＮプロモーター領域」という用語は、ｆｂａ１遺伝子の「ＡＴＧ」翻訳開始コドンの前にあって発現に必要である５’上流非翻訳領域、ならびにｆｂａ１遺伝子のイントロンを有する５’コード領域部分を指す。適切なヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＦＢＡＩＮプロモーター領域の例については、国際公開第２００５／０４９８０５号パンフレットで述べられる。

【０１７９】

「ＧＰＤＩＮプロモーター」または「ＧＰＤＩＮプロモーター領域」という用語は、ｇｐｄ遺伝子の「ＡＴＧ」翻訳開始コドンの前にあって発現に必要である５’上流非翻訳領域、ならびにｇｐｄ遺伝子のイントロンを有する５’コード領域部分を指す。適切なヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＧＰＤＩＮプロモーター領域の例については、米国特許出願第１１／１８３６６４号明細書で述べられる。

【０１８０】

「ＹＡＴ１プロモーター」または「ＹＡＴ１プロモーター領域」という用語は、ｙａｔ１遺伝子によってコードされるアンモニウム輸送体酵素（ＴＣ２．Ａ．４９；ジェンバンク（ＧｅｎＢａｎｋ）登録番号ＸＭ＿５０４４５７）の「ＡＴＧ」翻訳開始コドンの前にあって、発現に必要である５’上流非翻訳領域を指す。適切なヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＹＡＴ１プロモーター領域の例については、米国特許出願第１１／１８５３０１号明細書で述べられる。

【０１８１】

「ＥＸＰ１プロモーター」または「ＥＸＰ１プロモーター領域」という用語は、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）「ＹＡＬＩ０Ｃ１２０３４ｇ」遺伝子（ジェンバンク登録番号ＸＭ＿５０１７４５）によってコードされるタンパク質の「ＡＴＧ」翻訳開始コドンの前にあって、発現に必要である５’上流非翻訳領域を指す。「ＹＡＬＩ０Ｃ１２０３４ｇ」と、ｓｐ｜Ｑ１２２０７　Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）非古典的輸出タンパク質２（その機能が、開裂可能なシグナル配列を欠くタンパク質輸出の新規経路に関与する）との顕著な相同性に基づいて、この遺伝子をＥＸＰ１と命名されたタンパク質をコードするｅｘｐ１遺伝子とここで命名する。適切なヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＥＸＰ１プロモーター領域の例は配列番号２２１として述べられるが、これは本来、制限を意図するものではない。当業者は、ＥＸＰ１プロモーター配列の正確な境界が完全に画定されていないため、長さが増大または減少したＤＮＡ断片が、同一のプロモーター活性を有してもよいことを認識するであろう。

【０１８２】

「プロモーター活性」という用語は、プロモーターの転写効率のアセスメントを指す。これは例えば（例えばノーザンブロット法またはプライマー伸長法による）プロモーターからのｍＲＮＡ転写量の測定によって直接に、またはプロモーターから発現する遺伝子産

物量を測定して間接に判定されてもよい。

【０１８３】

「イントロン」とは、ほとんどの真核生物において、（コード領域、５’非コード領域、または３’非コード領域のいずれかの中の）遺伝子配列中に見られる非コードＤＮＡ配列である。それらの全機能は知られていないが、いくつかのエンハンサーは、イントロン中に位置する（ジャコペリ（Ｇｉａｃｏｐｅｌｌｉ），Ｆ．ら著、「Ｇｅｎｅ　Ｅｘｐｒ．」１１：９５～１０４頁（２００３年））。これらのイントロン配列は転写されるが、ｍＲＮＡがタンパク質に翻訳される前にｍＲＮＡ前駆体転写物内から除去される。このイントロン除去プロセスは、イントロンのどちらかの側の配列（エクソン）の自己スプライシングによって起きる。

【０１８４】

「エンハンサー」という用語は、隣接する真核生物プロモーターからの転写レベルを上昇させ、それによって遺伝子の転写を増大できるシス－制御配列を指す。エンハンサーは、数十キロベースのＤＮＡにわたってプロモーターに作用でき、それらが制御するプロモーターに対して５’または３’であることができる。エンハンサーはまた、イントロン内に位置できる。

【０１８５】

「３’非翻訳配列」および「転写ターミネーター」と言う用語は、コード配列の下流に位置したＤＮＡ配列を指す。これには、ｍＲＮＡプロセッシングまたは遺伝子発現に影響できる調節シグナルをコードするポリアデニル化認識配列およびその他の配列が含まれる。ポリアデニル化シグナルは、通常ｍＲＮＡ前駆物質の３’末端へのポリアデニル酸トラクトの付加に影響することで特徴づけられる。３’領域は、転写、ＲＮＡプロセッシングまたは安定性、または関連コード配列の翻訳に影響できる。

【０１８６】

「ＲＮＡ転写物」とは、ＲＮＡポリメラーゼが触媒するＤＮＡ配列の転写から得られる生成物を指す。ＲＮＡ転写物がＤＮＡ配列の完全な相補的コピーである場合、それは一次転写物と称され、あるいはそれは一次転写物の転写後プロセッシングから誘導されるＲＮＡ配列であるかもしれず、成熟ＲＮＡと称される。「メッセンジャーＲＮＡ」または「ｍＲＮＡ」とはイントロンがなく、細胞によってタンパク質に翻訳されることができるＲＮＡを指す。「ｃＤＮＡ」とは、ｍＲＮＡに対して相補的であり、それから誘導される二重鎖ＤＮＡを指す。「センスＲＮＡ」とは、ｍＲＮＡを含み、細胞によってタンパク質に翻訳されることができるＲＮＡ転写物を指す。「アンチセンスＲＮＡ」とは、標的一次転写物またはｍＲＮＡの全部または一部に相補的であり、標的遺伝子の発現をブロックするＲＮＡ転写物を指す（米国特許第５，１７０，０６５号明細書、国際出願公開第９９／２８５０８号パンフレット）。アンチセンスＲＮＡの相補性は、特定遺伝子転写物のあらゆる部分、すなわち５’非コード配列、３’非コード配列、またはコード配列にあってもよい。「機能性ＲＮＡ」とは、翻訳されないがそれでもなお細胞プロセスに影響するアンチセンスＲＮＡ、リボザイムＲＮＡ、またはその他のＲＮＡを指す。

【０１８７】

「作動可能に連結した」と言う用語は、１つの機能が他方の機能によって影響されるような、単一核酸断片上の核酸配列のつながりを指す。例えばプロモーターがコード配列の発現に影響できる（すなわちコード配列がプロモーターの転写調節下にある）場合、それはそのコード配列と作動可能に連結する。コード配列はセンスまたはアンチセンスオリエンテーションで、制御配列に作動可能に連結できる。

【０１８８】

「発現」と言う用語は、ここでの用法では、本発明の核酸断片から誘導されるセンス（ｍＲＮＡ）またはアンチセンスＲＮＡの転写および安定した蓄積を指す。発現はまた、ｍＲＮＡのポリペプチドへの翻訳を指してもよい。

【０１８９】

「成熟」タンパク質とは、転写後処理されたポリペプチド、すなわち一次翻訳生成物中

に存在するあらゆるプレまたはプロペプチドがそれから除去されたものを指す。「前駆物質」タンパク質とはｍＲＮＡ翻訳の一次生成物を指し、すなわちプレおよびプロペプチドは存在したままである。プレおよびプロペプチドは、細胞内局在化シグナルであってもよい（が、これに限定されるものではない）。

【０１９０】

「リコンビナーゼ」という用語は、部位特異的遺伝子組換えを実行して、ＤＮＡ構造を変更させる酵素を指し、トランスポサーゼ、ラムダ組み込み／切除酵素、ならびに部位特異的リコンビナーゼが挙げられる。

【０１９１】

「リコンビナーゼ部位」または「部位特異的リコンビナーゼ配列」とは、リコンビナーゼが認識して結合するＤＮＡ配列を意味する。これは、機能性が維持されてリコンビナーゼ酵素がなおも部位を認識し、ＤＮＡ配列に結合して２つの隣接するリコンビナーゼ部位間の遺伝子組換えを触媒できるならば、野性型または突然変異リコンビナーゼ部位であってもよいものと理解される。

【０１９２】

「形質転換」とは、遺伝的に安定した遺伝形質をもたらす、宿主生物への核酸分子の転移を指す。核酸分子は、例えば自律的に複製するプラスミドであってもよく、またはそれは宿主生物のゲノム中に組み込まれてもよい。形質転換核酸断片を含有する宿主生物は、「遺伝子導入」または「組換え」または「形質転換」生物と称される。

【０１９３】

「プラスミド」、「ベクター」、および「カセット」と言う用語は、細胞の中心的代謝の一部ではない遺伝子を運ぶことが多く、通常環状二本鎖ＤＮＡ断片の形態である染色体外要素を指す。このような要素は、あらゆる供給源から誘導される一本鎖または二本鎖ＤＮＡまたはＲＮＡの配列、ゲノム一体化配列、直鎖または環状のファージまたはヌクレオチド配列を自律的に複製するかもしれず、そこではいくつかのヌクレオチド配列が独自の構成に連結または組換えされ、それは選択された遺伝子産物のために、適切な３’非翻訳配列と共にプロモーター断片およびＤＮＡ配列を細胞中に導入することができる。「発現カセット」とは、外来性遺伝子を含有し、外来性遺伝子に加えて外来性宿主におけるその遺伝子の促進された発現を可能にする要素を有する特定のベクターを指す。

【０１９４】

「相同的組換え」と言う用語は、（交差中の）２つのＤＮＡ分子間のＤＮＡ断片の交換を指す。交換される断片は、２個のＤＮＡ分子間で同一ヌクレオチド配列の部位（すなわち「相同性領域」）に挟まれる。「相同性領域」と言う用語は、相同的組換えに関与する、核酸断片上の互いに相同性を有するひと続きのヌクレオチド配列を指す。効果的な相同的組換えは、一般に長さが少なくとも約１０ｂｐである相同性領域で起き、少なくとも約５０ｂｐの長さが好ましい。典型的に遺伝子組換えが意図される断片は、標的を定めた遺伝子中断または置換が所望される少なくとも２つの相同性領域を含有する。

【０１９５】

「配列分析ソフトウェア」と言う用語は、ヌクレオチドまたはアミノ酸配列の分析のために有用なあらゆるコンピュータアルゴリズムまたはソフトウェアプログラムを指す。「配列分析ソフトウェア」は、市販のものでも、あるいは独立して開発されてもよい。典型的な配列分析ソフトウェアとしては、１．）ウィスコンシン州マディソンのジェネティック・コンピュータ・グループ（Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ（ＧＣＧ）（Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ））からのＧＣＧパッケージプログラム、ウィスコンシン・パッケージ（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｐａｃｋａｇｅ）バージョン９．０、２．）ＢＬＡＳＴＰ、ＢＬＡＳＴＮ、ＢＬＡＳＴＸ（アルトシュール（Ａｌｔｓｃｈｕｌ）ら著、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３～４１０頁（１９９０年））、３．）ウィスコンシン州マディソンのＤＮＡＳＴＡＲ（ＤＮＡＳＴＡＲ，Ｉｎｃ．（Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ））からのＤＮＡＳＴＡＲ、４．）ミシガン州アンアーバーのジーンコーズ社（Ｇｅｎｅ Ｃｏｄｅｓ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ（Ａｎｎ Ａｒｂｏｒ，ＭＩ））からのシーケンチャー

（Ｓｅｑｕｅｎｃｈｅｒ）、および５．）スミス－ウォーターマン・アルゴリズムを組み入れたＦＡＳＴＡプログラム（Ｗ．Ｒ．ピアソン（Ｐｅａｒｓｏｎ）著、Ｃｏｍｐｕｔ．Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓ．［Ｐｒｏｃ．Ｉｎｔ．Ｓｙｍｐ．］（１９９４年）、１９９２年会議、１１１～２０頁、スハイ，サンドル（Ｓｕｈａｉ，Ｓａｎｄｏｒ）編、Ｐｌｅｎｕｍ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＮＹ）が挙げられるが、これに限定されるものではない。本願明細書の文脈内では、配列分析ソフトウェアを分析のために使用する場合、分析結果は特に断りのない限り、言及されるプログラムの「デフォルト値」に基づくものと理解される。ここでの用法では、「デフォルト値」とは、最初に初期化されるときにソフトウェアに最初にロードされる、あらゆる値またはパラメータの組を意味する。

【０１９６】

「保存ドメイン」または「モチーフ」という用語は、進化的に関連するタンパク質の整合配列に沿った特定位置において保存された一組のアミノ酸を意味する。その他の位置のアミノ酸が相同的なタンパク質間で異なることができるのに対し、特定の位置で高度に保存されたアミノ酸は、タンパク質の構造、安定性、または活性に必須のアミノ酸を示唆する。それらはタンパク質相同体ファミリーの整合配列におけるそれらの高度な保存によって同定されるので、それらは新たに判定された配列のタンパク質が、以前同定されたタンパク質ファミリーに属するかどうかを判別するための識別子、または「シグネチャ」として使用できる。Δ１５デサチュラーゼ活性を有する真菌タンパク質の徴候であるモチーフは、配列番号２２３として提供される一方、Δ１２デサチュラーゼ活性を有する真菌タンパク質の徴候であるモチーフは、配列番号２２４として提供される。

【０１９７】

ここで使用される標準組換えＤＮＡおよび分子クローニング技術は技術分野でよく知られており、サムブルック（Ｓａｍｂｒｏｏｋ），Ｊ．、フリッチュ（Ｆｒｉｔｓｃｈ），Ｅ．Ｆ．、およびマニアティス（Ｍａｎｉａｔｉｓ），Ｔ．著、「分子クローニング：実験室マニュアル（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ）」第２版、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ（１９８９年）（以下マニアティス（Ｍａｎｉａｔｉｓ））；シルハビー（Ｓｉｌｈａｖｙ），Ｔ．Ｊ．、ベンナン（Ｂｅｎｎａｎ），Ｍ．Ｌ．、およびエンクイスト（Ｅｎｑｕｉｓｔ），Ｌ．Ｗ．著、「遺伝子融合実験（Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔｓ ｗｉｔｈ Ｇｅｎｅ Ｆｕｓｉｏｎｓ）」、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ：Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ（１９８４年）；およびオースベル（Ａｕｓｕｂｅｌ），Ｆ．Ｍ．ら著、「分子生物学現代プロトコル（Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ）」、Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ａｓｓｏｃ．ａｎｄ Ｗｉｌｅｙ－Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅによる出版（１９８７年）で述べられている。

【０１９８】

ＤＨＡ生成に好ましい微生物宿主：ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）

本出願人らの研究（ピカタッジョ（Ｐｉｃａｔａｇｇｉｏ）ら、国際公開第２００４／１０１７５７号パンフレット参照）に先だって、油性酵母は、ＰＵＦＡの生産プラットフォームとして使用するのに適した微生物クラスとして以前に調査されている。典型的に油性酵母として同定された属としては、以下が挙げられるが、これに限定されるものではない。ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）、カンジダ（Ｃａｎｄｉｄａ）、ロドトルラ（Ｒｈｏｄｏｔｏｒｕｌａ）、ロドスポリジウム（Ｒｈｏｄｏｓｐｏｒｉｄｉｕｍ）、クリプトコッカス（Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）、トリコスポロン（Ｔｒｉｃｈｏｓｐｏｒｏｎ）およびリポミセス（Ｌｉｐｏｍｙｃｅｓ）。より具体的には例示的な油合成酵母として、次が挙げられる。ロドスポリジウム・トルロイデス（Ｒｈｏｄｏｓｐｏｒｉｄｉｕｍ ｔｏｒｕｌｏｉｄｅｓ）、リポミセス・スターケイ（Ｌｉｐｏｍｙｃｅｓ ｓｔａｒｋｅｙｉｉ）、Ｌ．リポフェラス（ｌｉｐｏｆｅｒｕｓ）、カンジダ・レブカウフィ（Ｃａｎｄｉｄａ ｒｅｖｋａｕｆｉ）、Ｃ．プリケリーマ（ｐｕｌｃｈｅｒｒｉｍａ）、Ｃ．トロ

ピカリス（ｔｒｏｐｉｃａｌｉｓ）、Ｃ．ユチリス（ｕｔｉｌｉｓ）、トリコスポロン・プランズ（Ｔｒｉｃｈｏｓｐｏｒｏｎ ｐｕｌｌａｎｓ）、Ｔ．クタネウム（ｃｕｔａｎｅｕｍ）、ロドトルラ・グルチヌス（Ｒｈｏｄｏｔｏｒｕｌａ ｇｌｕｔｉｎｕｓ）、Ｒ．グラミニス（ｇｒａｍｉｎｉｓ）、およびヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）（以前はカンジダ・リポリチカ（Ｃａｎｄｉｄａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）として分類された）。

【０１９９】

油性酵母は、ＤＨＡの経済的な商業生産の宿主生物としてのそれらの使用を容易にする、いくつかの性質を有すると見なされる。第１に生物体は自然に油合成および蓄積ができるものとして定義され、そこでは油は、細胞乾燥重量の約２５％を超え、より好ましくは細胞乾燥重量の約３０％を超え、そして最も好ましくは細胞乾燥重量の約４０％を超える量を構成できる。第２に高含油量で油性酵母を生育させる技術は、十分に開発されている（例えばＥＰ第０ ００５ ２７７Ｂ１号明細書；ラトレッジ（Ｒａｔｌｅｄｇｅ），Ｃ．著、Ｐｒｏｇ．Ｉｎｄ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．１６：１１９～２０６頁（１９８２年）参照）。そして、これらの生物は、過去に多様な目的のために商業的に使用されている。例えばヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）の様々な株は、歴史的に以下の製造および生産のために使用されている。イソシトレートリアーゼ（ＤＤ第２５９６３７号明細書）；リパーゼ（ＳＵ第１４５４８５２号明細書、国際公開第２００１０８３７７３号パンフレット、ＤＤ第２７９２６７号明細書）；ポリヒドロキシアルカノアート（国際公開第２００１０８８１４４号パンフレット）；クエン酸（ＲＵ第２０９６４６１号明細書、ＲＵ第２０９０６１１号明細書、ＤＤ第２８５３７２号明細書、ＤＤ第２８５３７０号明細書、ＤＤ第２７５４８０号明細書、ＤＤ第２２７４４８号明細書、ＰＬ第１６００２７号明細書）；エリトリトール（ＥＰ第７７０６８３号明細書）；２－オキソグルタル酸（ＤＤ第２６７９９９号明細書）；γ－デカラクトン（米国特許第６，４５１，５６５号明細書、ＦＲ第２７３４８４３号明細書）；γ－ドデカラクトン（ＥＰ第５７８３８８号明細書）；およびピルビン酸（特開平０９－２５２７９０号公報）。

【０２００】

油性酵母として分類される生物から、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）がここでの目的で好ましい微生物宿主として選択された。この選択は、ω－３脂肪酸をＴＡＧ画分に組み込める油性株が利用でき、生物が遺伝的操作に適しており、種が以前に食物等級クエン酸の安全食品認定（米国食品医薬品局に従った「ＧＲＡＳ」）供給源として使用された知識に基づいた。さらに別の実施形態では、高脂質含量（パーセント乾燥重量として測定される）および高容量生産性（ｇ／Ｌｈ$^{-1}$として測定される）を有する野生型株の同定を目的とする予備的研究の結果、最も好ましいのはＡＴＣＣ＃２０３６２、ＡＴＣＣ＃８８６２、ＡＴＣＣ＃１８９４４、ＡＴＣＣ＃７６９８２、および／またはＬＧＡＭＳ（７）１（パパニコラオウ（Ｐａｐａｎｉｋｏｌａｏｕ），Ｓ．、およびアゲリス（Ａｇｇｅｌｉｓ），Ｇ．著、Ｂｉｏｒｅｓｏｕｒ．Ｔｅｃｈｎｏｌ．８２（１）：４３～９頁（２００２年））と命名されたＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）株である

【０２０１】

国際公開第２００４／１０１７５７号パンフレットで述べられるように、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）は、以前にω－３／ω－６生合成経路をコードする遺伝子の導入および発現によって遺伝子改変され、１．３％のＡＲＡおよび１．９％のＥＰＡをそれぞれ生成した。より具体的には（ＡＲＡ合成のためのΔ６デサチュラーゼ、Δ５デサチュラーゼ、および高－親和力ＰＵＦＡ $C_{18/20}$エロンガーゼ、またはＥＰＡ合成のためのΔ６デサチュラーゼ、Δ５デサチュラーゼ、高－親和力ＰＵＦＡ $C_{18/20}$エロンガーゼ、およびコドン最適化Δ１７デサチュラーゼのどちらかを含んでなる）２つの異なるＤＮＡ発現コンストラクトを別々に形質転換して、酵素オロチジン－５’－リン酸デカルボキシラーゼ（ＥＣ４．１．１．２３）をコードす

るＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）染色体のＵＲＡ３遺伝子に組み込んだ。適切な基質を供給された宿主細胞のＧＣ分析からは、ＡＲＡおよびＥＰＡの生成が検出された。この研究は、ω－６およびω－３脂肪酸生成のために油性宿主が遺伝子改変される能力のコンセプトの証明を実証するのには適切であったが、ＤＨＡの生成を実証できないかったか、または総油画分中５％を超えるＤＨＡ、より好ましくは総油画分中１０％を超えるＤＨＡ、さらにより好ましくは総油画分中１５～２０％を超えるＤＨＡ、最も好ましくは総油画分中２５～３０％を超えるＤＨＡの合成を可能にするのに必要な複雑な代謝エンジニアリングを示唆、または実施できなかった。

【０２０２】

同時係属米国仮特許出願第６０／６２４８１２号明細書では、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）内で複雑な代謝操作を実施して、（１）ＥＰＡの合成および高蓄積を可能にする好ましいデサチュラーゼおよびエロンガーゼを同定し、（２）ω脂肪酸の貯蔵脂質プール内への転移を可能にするアシルトランスフェラーゼの活性を操作し、（３）マルチコピーで発現する強力プロモーターおよび／またはコドン－最適化の使用によってデサチュラーゼ、エロンガーゼ、およびアシルトランスフェラーゼを過剰発現し、（４）ＥＰＡの総蓄積を減少させるＰＵＦＡ生合成経路内の特異的遺伝子の発現を下方制御し、（５）ＥＰＡ生産に影響する経路および包括的制御因子を操作する。これは、特定の１つのヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）組換え株において２８％までのＥＰＡの生産をもたらした。

【０２０３】

本出願では、類似の複雑な代謝操作が実施されて、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）組換え株の全油画分中に５％を超えるＤＨＡの生産がもたらされる。より具体的には、株を遺伝子改変してΔ６デサチュラーゼ／Δ６エロンガーゼ経路を利用し、代案の実施形態では、形質転換株を遺伝子改変してΔ９エロンガーゼ／Δ８デサチュラーゼ経路を利用し、それによってＧＬＡを欠く高ＤＨＡ油を生成できた。利用された代謝操作の態様について下で述べ、この油性酵母においてＤＨＡ生産性を顕著に増強するために実施できる追加的な操作および発酵方法についても述べる。

【０２０４】

概説：脂肪酸およびトリアシルグリセロールの微生物生合成

一般に、油性微生物中の脂質蓄積は、増殖培地中に存在する全体的な炭素対窒素比に答えて誘発される。油性微生物中に遊離パルミチン酸（１６：０）の新規（ｄｅ　ｎｏｖｏ）合成をもたらすこのプロセスについては、国際公開第２００４／１０１７５７号パンフレットで詳細に述べられる。パルミチン酸は、エロンガーゼおよびデサチュラーゼの作用を通じて形成される、より長鎖の飽和および不飽和脂肪酸誘導体の前駆物質である。例えばパルミチン酸は、Δ９デサチュラーゼの作用によってその不飽和誘導体［パルミトレイン酸（１６：１）］に変換される。同様にパルミチン酸は、$C_{16/18}$脂肪酸エロンガーゼによって延長されてステアリン酸（１８：０）が形成し、それはΔ９デサチュラーゼによってその不飽和誘導体に変換され、それによってオレイン（１８：１）酸を生じることができる。

【０２０５】

ＴＡＧ（脂肪酸の主要な貯蔵単位）は、以下が関与する一連の反応によって形成される。１．）リゾホスファチジン酸を生じる、アシルトランスフェラーゼによるアシル－ＣｏＡの１分子のグリセロール－３－リン酸塩へのエステル化、２．）１，２－ジアシルグリセロールリン酸塩（一般にホスファチジン酸として同定される）を生じる、アシルトランスフェラーゼによるアシル－ＣｏＡの第２の分子のエステル化、３．）１，２－ジアシルグリセロール（ＤＡＧ）を生じる、ホスファチジン酸ホスファターゼによるリン酸塩の除去、および４．）ＴＡＧを形成する、アシルトランスフェラーゼの作用による第３の脂肪酸の付加（図２）。

【０２０６】

飽和および不飽和脂肪酸および短鎖および長鎖脂肪酸をはじめとする、幅広い脂肪酸を

ＴＡＧに組み込むことができる。アシルトランスフェラーゼによってＴＡＧに組み込むことができる脂肪酸の制限を意図しない例のいくつかとしては、カプリン（１０：０）、ラウリン（１２：０）、ミリスチン（１４：０）、パルミチン（１６：０）、パルミトレイン（１６：１）、ステアリン（１８：０）、オレイン（１８：１）、バクセン（１８：１）、ＬＡ、エレオステアリン酸（１８：３）、ＡＬＡ、ＧＬＡ、アラキジン酸（２０：０）、ＥＤＡ、ＥＴｒＡ、ＤＧＬＡ、ＥＴＡ、ＡＲＡ、ＥＰＡ、ベヘン酸（２２：０）、ＤＰＡ、ＤＨＡ、リグノセリン（２４：０）、ネルボン（２４：１）、セロチン（２６：０）、およびモンタン（２８：０）脂肪酸が挙げられる。本発明の好ましい実施形態では、ＴＡＧへのＤＨＡの組み込みが最も望ましい。

【０２０７】

ω－３脂肪酸であるＤＨＡの生合成

オレイン酸がＤＨＡに変換される代謝プロセスは、炭素原子付加を通じた炭素鎖の延長、および二重結合添加を通じた分子の不飽和化を伴う。これは、小胞体膜内に存在する一連の特別な不飽和化および延長酵素を必要とする。しかし図１に示され下で述べられるように、ＤＨＡ生成のための複数の代案の経路が存在する（全ての場合において、ＤＨＡ生成にはＥＰＡの合成が必要となるが）。

【０２０８】

具体的には、全ての経路は、Δ１２デサチュラーゼの作用によるオレイン酸から第１のω－６脂肪酸であるＬＡ（１８：２）への初期変換を必要とする。次にＥＰＡ生合成のための「ω－６Δ６デサチュラーゼ／Δ６エロンガーゼ経路」を使用し（それによって主としてω－６脂肪酸の形成を通じてＥＰＡ生合成が起きる）、ＰＵＦＡが次のようにして形成される。（１）Δ６デサチュラーゼの作用によってＬＡがＧＬＡに変換される、（２）$C_{18/20}$エロンガーゼの作用によってＧＬＡがＤＧＬＡに変換され、（３）Δ５デサチュラーゼの作用によってＤＧＬＡがＡＲＡに変換され、（４）Δ１７デサチュラーゼの作用によってＡＲＡがＥＰＡに変換される。代案としては、主として「ω－３Δ６デサチュラーゼ／Δ６エロンガーゼ経路」を通じたω－３脂肪酸の形成を通じてＥＰＡ生合成が起きる場合、（１）Δ１５デサチュラーゼの作用によってＬＡが第１のω－３脂肪酸であるＡＬＡに変換され、（２）Δ６デサチュラーゼの作用によってＡＬＡがＳＴＡに変換され、（３）$C_{18/20}$エロンガーゼの作用によってＳＴＡがＥＴＡに変換され、（４）Δ５デサチュラーゼの作用によってＥＴＡがＥＰＡに変換される。場合によりΔ１７デサチュラーゼの作用によってＤＧＬＡからＥＴＡが生成する場合、またはΔ６デサチュラーゼ、$C_{18/20}$エロンガーゼ、およびΔ５デサチュラーゼと併せて、Δ１５デサチュラーゼおよびΔ１７デサチュラーゼの双方が同時発現される場合のどちらかで、ＥＰＡ生成に先だってω－６およびω－３脂肪酸の組み合わせを合成できる。

【０２０９】

ＥＰＡ生合成の代案の経路は、Δ９エロンガーゼおよびΔ８デサチュラーゼを利用する。より具体的には、「ω－６Δ９エロンガーゼ／Δ８デサチュラーゼ経路」を通じて、Δ９エロンガーゼの作用によってＬＡがＥＤＡに変換され、次にΔ８デサチュラーゼがＥＤＡをＤＧＬＡに変換する。引き続くΔ５デサチュラーゼの作用によるＤＧＬＡ不飽和化からは、上述のようにＡＲＡが生じ、そこでＡＲＡはΔ１７デサチュラーゼの作用によって直接にＥＰＡに変換できる。対照的に「ω－３Δ９エロンガーゼ／Δ８デサチュラーゼ経路」を使用して、Δ１５デサチュラーゼの作用によってＬＡが最初にＡＬＡに変換される。次にΔ９エロンガーゼの作用によってＡＬＡがＥＴｒＡに変換され、それにＥＴｒＡをＥＴＡに変換するΔ８デサチュラーゼが続く。引き続くΔ５デサチュラーゼの作用によるＥＴＡの不飽和化によって、ＥＰＡが生じる。

【０２１０】

ＥＰＡの合成に際して、$C_{20/22}$エロンガーゼは基質からＤＰＡへの変換に関与する。次にΔ４デサチュラーゼの作用によってＤＰＡはＤＨＡに変換される。

【０２１１】

分かりやすくするために、これらの各経路ならびにそれらの際立った特性を下の表に要

約する。

【０２１２】

【表１１】

表4

DHA生合成のための代案の生合成経路

名称	DHAのために最低限必要な遺伝子*	経路
ω-6Δ6デサチュラーゼ/Δ6エロンガーゼ経路	Δ6D, $C_{18/20}$ ELO, Δ5D, Δ17D, $C_{20/22}$ ELO, Δ4D	PUFA製品のω-3/ω-6比を改善する
ω-3Δ6デサチュラーゼ/Δ6エロンガーゼ経路	Δ15D, Δ6D, $C_{18/20}$ ELO, Δ5D, $C_{20/22}$ ELO, Δ4D	引き続くPUFA生合成のために基質のω-3/ω-6比を改善し、GLAを欠く油を生成する
連結Δ6デサチュラーゼ/Δ6エロンガーゼ経路	Δ15D, Δ6D, $C_{18/20}$ ELO, Δ5D, Δ17D, $C_{20/22}$ ELO, Δ4D	---
ω-6Δ9エロンガーゼ/Δ8デサチュラーゼ経路	Δ9 ELO, Δ8D, Δ5D, Δ17D, $C_{20/22}$ ELO, Δ4D	PUFA製品のω-3/ω-6比を改善する
ω-3Δ9エロンガーゼ/Δ8デサチュラーゼ経路	Δ15D, Δ9 ELO, Δ8D, Δ5D, $C_{20/22}$ ELO, Δ4D	引き続くPUFA生合成のために基質のω-3/ω-6比を改善し、GLAを欠く油を生成する
連結Δ9エロンガーゼ/Δ8デサチュラーゼ経路	Δ15D, Δ9 ELO, Δ8D, Δ5D, Δ17D, $C_{20/22}$ ELO, Δ4D	---

* 略語:「D」 = デサチュラーゼ、「ELO」エロンガーゼ

【０２１３】

ＤＨＡ合成のための微生物遺伝子の選択

ＤＨＡ生成のためにヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）に導入することが必要な特定の機能性は、宿主細胞（およびその天然ＰＵＦＡプロフィールおよび／またはデサチュラーゼ／エロンガーゼプロフィール）、基質の入手可能性、および所望の最終産物に左右されることが考察される。天然宿主細胞について、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）は１８：２脂肪酸を自然に生成し、したがって天然Δ１２デサチュラーゼ（配列番号２８および２９、国際公開第２００４／１０４１６７号パンフレット参照）を有することが知られている。所望の最終産物については、Δ９エロンガーゼ／Δ８デサチュラーゼ経路の発現結果に対立するものとして、Δ６デサチュラーゼ／Δ６エロンガーゼ経路の発現結果が、このようにして生成された油の最終脂肪酸プロフィールとして上に記述されている（すなわち高ＤＨＡ油の最終組成中の％ＧＬＡ）。

【０２１４】

したがっていくつかの実施形態では、Δ６デサチュラーゼ／Δ６エロンガーゼ経路を通じてＤＨＡを生成することが望ましい。したがってＤＨＡ生合成のために、最低限、Δ６デサチュラーゼ、Ｃ１８／２０エロンガーゼ、Δ５デサチュラーゼ、およびΔ１７デサチュラーゼまたはΔ１５デサチュラーゼのどちらか（または双方）、Ｃ２０／２２エロンガーゼおよびΔ４デサチュラーゼの遺伝子を宿主生物に導入して発現させなくてはならない。さらに好ましい実施形態では、宿主株は、Δ９デサチュラーゼ、Δ１２デサチュラーゼ、Ｃ１４／１６エロンガーゼ、およびＣ１６／１８エロンガーゼの少なくとも１つをさら

に含む。

【０２１５】

代案の実施形態では、ＧＬＡの同時合成なしにＤＨＡを生成することが望ましい（したがってΔ９エロンガーゼ／Δ８デサチュラーゼ経路の発現を要する）。その結果、このストラテジーは、ＤＨＡ生合成のために、最低限、Δ９エロンガーゼ、Δ８デサチュラーゼ、Δ５デサチュラーゼ、Δ１７デサチュラーゼまたはΔ１５デサチュラーゼのどちらか（または双方）、$C_{20/22}$エロンガーゼおよびΔ４デサチュラーゼの遺伝子を宿主生物に導入して発現することを要する。さらに好ましい実施形態では、宿主株は、Δ９デサチュラーゼ、Δ１２デサチュラーゼ、$C_{14/16}$エロンガーゼ、および$aC_{16/18}$エロンガーゼの少なくとも１つをさらに含む。

【０２１６】

当業者は、ＤＨＡ生合成のために所望される各酵素をコードする、様々な候補遺伝子を同定できるであろう。有用なデサチュラーゼおよびエロンガーゼ配列はあらゆる供給源に由来してもよく、例えば天然供給源（細菌、藻類、真菌、植物、動物などから）から単離され、半合成経路によって生成され、または新規（ｄｅ　ｎｏｖｏ）合成される。宿主中に導入されるデサチュラーゼおよびエロンガーゼ遺伝子の特定の供給源は本発明にとって重大でないが、デサチュラーゼまたはエロンガーゼ活性を有する特異的ポリペプチド選択のための配慮としては以下が挙げられる。１．）ポリペプチドの基質特異性、２．）ポリペプチドまたはその構成要素が律速酵素であるかどうか、３．）デサチュラーゼまたはエロンガーゼが所望のＰＵＦＡ合成に必須であるかどうか、および／または４．）ポリペプチドが必要とする補助因子。発現したポリペプチドは、好ましくは宿主細胞中のその位置の生化学的環境に適合したパラメーターを有する。例えばポリペプチドは、宿主細胞中のその他の酵素と基質獲得のために争わなくてはならないかもしれない。したがって宿主細胞中のＰＵＦＡ生成を修正する特定ポリペプチドの適合性を判定するのに、ポリペプチドのK_Mおよび比活性の分析を考慮してもよい。特定の宿主細胞で使用されるポリペプチドは、意図される宿主細胞中に存在する生化学的条件下で機能できるものであるが、それ以外には所望のＰＵＦＡを修正できるデサチュラーゼまたはエロンガーゼ活性を有する、あらゆるポリペプチドであることができる。

【０２１７】

追加的実施形態では、特定の各デサチュラーゼおよび／またはエロンガーゼの変換効率を考慮することもまた有用であろう。より具体的には、各酵素が基質を生成物に変換するのに１００％の効率で機能することは稀なので、宿主細胞中に生成される未精製油の最終脂質プロフィールは、典型的に（例えば１００％のＤＨＡ油とは対照的に）所望のＤＨＡならびに様々な上流中間ＰＵＦＡからなる様々なＰＵＦＡの混合物である。したがってＤＨＡ生合成を最適化するのに際し、各酵素の変換効率の配慮もまた重要な変数であり、生成物の最終所望の脂質プロフィールの観点から考慮しなくてはならない。

【０２１８】

上の各考察を念頭に置いて、公的に入手できる文献（例えばジェンバンク）、特許文献、およびＰＵＦＡを生成する能力を有する微生物の実験的分析に従って、適切なデサチュラーゼおよびエロンガーゼ活性を有する候補遺伝子を同定できる。例えば次のジェンバンク登録番号は、ＤＨＡ生合成で有用な公的に入手できる遺伝子の例を指す。ＡＹ１３１２３８、Ｙ０５５１１８、ＡＹ０５５１１７、ＡＦ２９６０７６、ＡＦ００７５６１、Ｌ１１４２１、ＮＭ＿０３１３４４、ＡＦ４６５２８３、ＡＦ４６５２８１、ＡＦ１１０５１０、ＡＦ４６５２８２、ＡＦ４１９２９６、ＡＢ０５２０８６、ＡＪ２５０７３５、ＡＦ１２６７９９、ＡＦ１２６７９８（Δ６デサチュラーゼ）；ＡＦ３９０１７４（Δ９エロンガーゼ）；ＡＦ１３９７２０（Δ８デサチュラーゼ）；ＡＦ１９９５９６、ＡＦ２２６２７３、ＡＦ３２０５０９、ＡＢ０７２９７６、ＡＦ４８９５８８、ＡＪ５１０２４４、ＡＦ４１９２９７、ＡＦ０７８７９、ＡＦ０６７６５４、ＡＢ０２２０９７（Δ５デサチュラーゼ）；ＡＡＧ３６９３３、ＡＦ１１０５０９、ＡＢ０２００３３、ＡＡＬ１３３００、ＡＦ４１７２４４、ＡＦ１６１２１９、ＡＹ３３２７４７、ＡＡＧ３６９３３、ＡＦ

１１０５０９、ＡＢ０２００３３、ＡＡＬ１３３００、ＡＦ４１７２４４、ＡＦ１６１２１９、Ｘ８６７３６、ＡＦ２４０７７７、ＡＢ００７６４０、ＡＢ０７５５２６、ＡＰ００２０６３（Δ１２デサチュラーゼ）；ＮＰ＿４４１６２２、ＢＡＡ１８３０２、ＢＡＡ０２９２４、ＡＡＬ３６９３４（Δ１５デサチュラーゼ）；ＡＦ３３８４６６、ＡＦ４３８１９９、Ｅ１１３６８、Ｅ１１３６７、Ｄ８３１８５、Ｕ９０４１７、ＡＦ０８５５００、ＡＹ５０４６３３、ＮＭ＿０６９８５４、ＡＦ２３０６９３（Δ９デサチュラーゼ）；ＡＹ６３０５７４、ＡＹ３３２７４７、ＡＹ２７８５５８、ＡＦ４８９５８９（Δ４デサチュラーゼ）、およびＮＰ＿０１２３３９、ＮＰ＿００９９６３、ＮＰ＿０１３４７６、ＮＰ＿５９９２０９、ＢＡＢ６９８８８、ＡＦ２４４３５６、ＡＡＦ７０４１７、ＡＡＦ７１７８９、ＡＦ３９０１７４、ＡＦ４２８２４３、ＮＰ＿９５５８２６、ＡＦ２０６６６２、ＡＦ２６８０３１、ＡＹ５９１３３５、ＡＹ５９１３３６、ＡＹ５９１３３７、ＡＹ５９１３３８、ＡＹ６０５０９８、ＡＹ６０５１００、ＡＹ６３０５７３（$C_{14/16}$、$C_{16/18}$、$C_{18/20}$、および$C_{20/22}$エロンガーゼ）。同様に特許文献は、ＰＵＦＡ生産に関与する遺伝子の多数の追加的ＤＮＡ配列（および／または上の遺伝子のいくつかに関する詳細およびそれらの単離方法）を提供する［例えば国際公開第０２／０７７２１３号パンフレット（Δ９エロンガーゼ）；国際公開第００／３４４３９号パンフレットおよび国際公開第０４／０５７００１号パンフレット（Δ８デサチュラーゼ）；米国特許第５、９６８、８０９号明細書（Δ６デサチュラーゼ）；米国特許第５，９７２，６６４明細書および米国特許第６，０７５，１８３号明細書（Δ５デサチュラーゼ）；国際公開第号９４／１１５１６パンフレット、米国特許第５，４４３，９７４号明細書、国際公開第０３／０９９２１６号パンフレットおよび国際公開第０５／０４７４８５号パンフレット（Δ１２デサチュラーゼ）；国際公開第９３／１１２４５号パンフレット（Δ１５デサチュラーゼ）；国際公開第９１／１３９７２号パンフレットおよび米国特許第５，０５７，４１９号明細書（Δ９デサチュラーゼ）；米国特許出願公開第２００３／０１９６２１７号明細書（Δ１７デサチュラーゼ）；国際公開第０２／０９０４９３号パンフレット（Δ４デサチュラーゼ）、および国際公開第００／１２７２０号パンフレット、米国特許第６，４０３，３４９号明細書、米国特許第６，６７７，１４５号明細書、米国特許出願公開第２００２／０１３９９７４　Ａ１号明細書、米国特許出願公開第２００４／０１１１７６３号明細書（$C_{14/16}$、$C_{16/18}$、$C_{18/20}$、および$C_{20/22}$エロンガーゼ）］。これらの各特許および特許出願は、その内容全体を参照によって本明細書に組み込んだものとする。

【０２１９】

上の例は制限を意図するものではなく、（１）Δ６デサチュラーゼ、$C_{18/20}$エロンガーゼ、Δ５デサチュラーゼ、Δ１７デサチュラーゼまたはΔ１５デサチュラーゼのどちらか（または双方）、$C_{20/22}$エロンガーゼおよびΔ４デサチュラーゼ（そして場合によりΔ９デサチュラーゼ、Δ１２デサチュラーゼ、$C_{14/16}$エロンガーゼおよび／または$C_{16/18}$エロンガーゼをコードするその他の遺伝子）、または（２）Δ９エロンガーゼ、Δ８デサチュラーゼ、Δ５デサチュラーゼ、Δ１７デサチュラーゼまたはΔ１５デサチュラーゼのどちらか（または双方）、$C_{20/22}$エロンガーゼおよびΔ４デサチュラーゼ（そして場合によりΔ９デサチュラーゼ、Δ１２デサチュラーゼ、$C_{14/16}$エロンガーゼおよび／または$C_{16/18}$エロンガーゼをコードするその他の遺伝子）をコードする、異なる供給源に由来する多数のその他の遺伝子が、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中への導入のために適している。

【０２２０】

ＤＨＡ合成のために好ましい遺伝子

しかしヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中での発現に適することができるデサチュラーゼおよびエロンガーゼの幅広い選択にも関わらず、本発明の好ましい実施形態では、デサチュラーゼおよびエロンガーゼは以下（またはその誘導体）から選択される。

【０２２１】

【表１２】

表5

ヤロウィア・リポリティカにおけるDHA生合成に好ましい

デサチュラーゼおよびエロンガーゼ

ORF	生物	参考文献	配列番号
Δ6デサチュラーゼ	*モルティエラ・アルピナ*	ジェンバンク登録番号AF465281、米国特許第5,968,809号明細書	1,2
Δ6デサチュラーゼ	*モルティエラ・アルピナ*	ジェンバンク登録番号AB070555	4,5
$C_{18/20}$エロンガーゼ（「ELO1」）	*モルティエラ・アルピナ*	ジェンバンク登録番号AX464731,国際公開第00/12720号パンフレット	22,23
$C_{18/20}$エロンガーゼ（「ELO2」）	スラウストキトリウム・アウレウム	米国特許第6,677,145号明細書	25,26
Δ9エロンガーゼ	イソクリシス・ガルバナ	ジェンバンク登録番号AF390174	69,70
Δ8デサチュラーゼ	ミドリムシ	同時係属米国特許出願第11/166993号明細書	77,78
Δ5デサチュラーゼ	*モルティエラ・アルピナ*	ジェンバンク登録番号AF067654、米国特許第6,075,183号明細書	6,7
Δ5デサチュラーゼ	イソクリシス・ガルバナ	国際公開第02/081668 A2号パンフレット	8,9
Δ5デサチュラーゼ	ヒト	ジェンバンク登録番号NP_037534	11,12
Δ5/Δ6デサチュラーゼ	ゼブラフィッシュ	ジェンバンク登録番号AF309556	14,15
Δ5/Δ6デサチュラーゼ	ゼブラフィッシュ	ジェンバンク登録番号BC068224	16
Δ5/Δ6デサチュラーゼ	ゼブラフィッシュ	-	17,18

【０２２２】

【表１３】

Δ17デサチュラーゼ	サプロレグニア・ディクリナ	米国特許出願公開第2003/0196217 A1号明細書	19,20
Δ4デサチュラーゼ	スラウストキトリウム・アウレウム	ジェンバンク登録番号AAN75707	104,105
$C_{20/22}$エロンガーゼ	オストレオコッカス・タウリ	ジェンバンク登録番号AY591336	100,101
$C_{16/18}$エロンガーゼ（「YE2」）	*ヤロウィア・リポリティカ*	-	94,95
$C_{16/18}$エロンガーゼ（「ELO3」）	*モルティエラ・アルピナ*	-	86,87
$C_{16/18}$エロンガーゼ（rELO2）	ドブネズミ	ジェンバンク登録番号AB071986	83,84
$C_{14/16}$エロンガーゼ（「YE1」）	*ヤロウィア・リポリティカ*	-	97,98
Δ12デサチュラーゼ	*ヤロウィア・リポリティカ*	国際公開第 2004/104167号パンフレット	28,29
Δ12デサチュラーゼ	モルティエラ・イザベリナ	ジェンバンク登録番号AF417245	30,31
Δ12デサチュラーゼ（Fm d12）	フザリウム・モニリフォルメ	国際公開第2005/047485号パンフレット	32,33
Δ12デサチュラーゼ（An d12）	アスペルギルス・ニデュランス	A.ニデュランスゲノムプロジェクト中のコンティグ1.15（scaffold 1）、AAG36933、国際公開第2005/047485号パンフレット	34,35
Δ12デサチュラーゼ	黄色コウジ菌（Aspergillus flavus）	ジェンバンク登録番号AY280867（VERSION AY280867.1、gi:30721844）、国際公開第2005/047485号パンフレット	36
Δ12デサチュラーゼ（Afd12p）	アスペルギルス・フミガーツス	アスペルギルス・フミガーツスゲノムプロジェクト中のAFA.133c 344248:345586逆転（AfA5C5.001c）、国際公開第2005/047485号パンフレット	37
Δ12デサチュラーゼ（Mg d12）	マグナポルテ・グリセア	M.グリセア（M.grisea）ゲノムプロジェクト中のコンティグ2.375中の遺伝子座MG01985.1、国際公開第2005/047485号パンフレット	38,39
Δ12デサチュラーゼ（Nc d12）	ニューロスポラ・クラッサ	ジェンバンク登録番号AABX01000374、国際公開第2005/047485号パンフレット	40,41
Δ12デサチュラーゼ（Fg d12）	フザリウム・グラミネアリウム	F.グラミネアリウム・ゲノムプロジェクト中のコンティグ1.233、国際公開第2005/047485号パンフレット	42,43

【０２２３】

【表１４】

Δ12デサチュラーゼ（Mad12）	*モルティエラ・アルピナ*	ジェンバンク登録番号AB020033	44,45
Δ12デサチュラーゼ（Skd12）	サッカロミセス・クリヴェリ	ジェンバンク登録番号BAD08375	46
Δ12デサチュラーゼ（Kld12p）	クリヴェロミセス・ラクチス	「酵母菌プロジェクト・ジェノレビュール」（バイオインフォマティクス・センター、LaBRI、フランス国タランスセデックス）のK.ラクチスデータベースのKlla0B:35614..36861アンチセンス（m）からのgnl｜GLV｜KLLA0B00473g ORF	47,48
Δ12デサチュラーゼ（Cad12p）	カンジダ・アルビカンス	ジェンバンク登録番号EAK94955	49
Δ12デサチュラーゼ（Dhd12p）	デバリオミセス・ハンセニCBS767	ジェンバンク登録番号CAG90237	50
Δ15デサチュラーゼ（Fm d15）	フザリウム・モニリフォルメ	国際公開第 2005/047479号パンフレット	51,52
Δ15デサチュラーゼ（An d15）	アスペルギルス・ニデュランス	A.ニデュランスゲノムプロジェクト中のコンティグ1.122（scaffold 9）、国際公開第2005/047479号パンフレット	53,54
Δ15デサチュラーゼ（Mg d15）	マグナポルテ・グリセア	M.グリセアゲノムプロジェクト中のコンティグ2.1597中の遺伝子座MG08474.1、国際公開第2005/047479号パンフレット	55,56
Δ15デサチュラーゼ（Nc d15）	ニューロスポラ・クラッサ	ジェンバンク登録番号AABX01000577、国際公開第2005/047479号パンフレット	57,58
Δ15デサチュラーゼ（Fg d15）	フザリウム・グラミネアリウム	F.グラミネアリウムゲノムプロジェクト中のコンティグ1.320（BAA33772.1）、国際公開第2005/047479号パンフレット	59,60
Δ15デサチュラーゼ（Mad15）	*モルティエラ・アルピナ*	ジェンバンク登録番号AB182163	61,62
Δ15デサチュラーゼ（Kld15p）	クリヴェロミセス・ラクチス	ジェンバンク登録番号XM_451551	63,64
Δ15デサチュラーゼ（Cad15p）	カンジダ・アルビカンス	ジェンバンク登録番号EAL03493	65
Δ15デサチュラーゼ（Skd15）	サッカロミセス・クリヴェリ	ジェンバンク登録番号BAD11952	66

【０２２４】

【表１５】

Δ15デサチュラーゼ（Dhd15p）	デバリオミセス・ハンセニCBS767	ジェンバンク登録番号CAG88182	67
Δ15デサチュラーゼ（Afd15p）	アスペルギルス・フミガーツス	ジェンバンク登録番号EAL85733	68

* 注記：*アスペルギルス・フミガーツス*ゲノムプロジェクトは、サンガー・インスティテュート（SangerInstitute）と、マンチェスター大学（University of Manchester）内の協力者と、ゲノム研究所（Institute for Genomic Research、TIGR）によって資金援助される。A.ニデュランス（nidulans）ゲノムプロジェクトは、マサチューセッツ州ケンブリッジのゲノム研究センター（Center for Genome Research、CGR（Cambridge,MA））によって資金援助される。M.グリセア（grisea）ゲノムプロジェクトは、CGRおよび国際イネいもち病ゲノムコンソーシアム（International Rice Blast Genome Consortium）によって資金援助される。F.グラミネアリウム（graminearium）ゲノムプロジェクトは、CGRおよび国際*ジベレラ・ゼアエ*・ゲノムコンソーシアム（International Gibberella zeae Genome Consortium、IGGR）によって資金援助される。

【０２２５】

本出願人らは様々なエロンガーゼの多数の分析を実施して、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中で発現する際の各酵素の基質特異性および／または基質選択性を判定または確認した。例えば２つのＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）エロンガーゼのコード配列は公的に入手でき、各タンパク質は推定上の長鎖脂肪酸アシルエロンガーゼとして注釈され、またはその他の脂肪酸エロンガーゼと顕著な相同性を共有しているが、これらの酵素の基質特異性はいまだかつて判定されていない。ここで実施した分析に基づいて、ＹＥ１は基質としてC_{14}脂肪酸を優先的に使用してC_{16}脂肪酸を生成する脂肪酸エロンガーゼ（すなわち$C_{14/16}$エロンガーゼ）であると判定され、ＹＥ２は基質としてC_{16}脂肪酸を優先的に使用してC_{18}脂肪酸を生成する脂肪酸エロンガーゼ（すなわち$C_{16/18}$エロンガーゼ）であると判定された。同様に新規Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＥＬＯ３遺伝子の同定に際して、配列はその他の脂肪酸エロンガーゼに相同的であると特性決定された。しかし$C_{16/18}$エロンガーゼとしてのＥＬＯ３の特異性を確認するために、脂質プロフィールの分析が必要であった。

【０２２６】

Δ１２デサチュラーゼについて、本出願人らはＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中で１８：２を生成する際に、フザリウム・モニリフォルメ（Ｆｕｓａｒｉｕｍ　ｍｏｎｉｌｉｆｏｒｍｅ）Δ１２デサチュラーゼ（配列番号３２によってコードされる）が、天然ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）Δ１２デサチュラーゼよりも高い効率で機能するという意外な発見をした（国際公開第２００５／０４７４８５号パンフレット参照）。具体的には、ＴＥＦプロモーター制御下にあるＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）Δ１２デサチュラーゼをコードするキメラ遺伝子の発現によって以前得られた（ＬＡの生成物蓄積５９％）よりも、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中でＴＥＦプロモーター制御下にあるＦ．モニリフォルメ（ｍｏｎｉｌｉｆｏｒｍｅ）Δ１２デサチュラーゼの発現が、高いレベルの１８：２を生成する（ＬＡの生成物蓄積６８％）と判定された。これはそれぞれ８５％対７４％の％基質変換（（［１８：２＋１８：３］／［１８：１＋１８：２＋１８：３］）×１００として計算される）の差に相当する。これらの結果に基づいて、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）の高ＤＨＡ生成株を操作する手段として、本真菌Ｆ．モニリフォルメ（ｍｏｎｉｌｉｆｏｒｍｅ）Δ１２デサチュラーゼの発現は、その他の知られているΔ１２デサチュラーゼよりも好ましい（しかし当業者は、例えばコドン最適化に続いてＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中でＦ．モニリフォルメ（ｍｏｎｉｌｉｆｏｒｍｅ）Δ１２デサチュラーゼの活性が増強できることを期待するであろう）。

【０２２７】

代案としては、最近、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）において、おそらく改善された効率で機能する５つの新しいΔ１２デサチュラーゼが同定されている。具体的には、サッカロミセス・クリヴェリ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙ

ｃｅｓ ｋｌｕｙｖｅｒｉ）Δ１２デサチュラーゼ（ジェンバンク登録番号ＢＡＤ０８３７５）についてワタナベ（Ｗａｔａｎａｂｅ）ら著、Ｂｉｏｓｃｉ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．Ｂｉｏｃｈｅｍｌ．６８（３）：７２１～７２７頁（２００４年）で述べられているのに対し、モルティエラ・アルピナ（Ｍｏｒｔｉｅｒｅｌｌａ ａｌｐｉｎａ）（ジェンバンク登録番号ＡＢ１８２１６３）からのものついてはサクラダニ（Ｓａｋｕｒａｄａｎｉ）ら著、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２６１（３）：８１２～８２０頁（１９９９年）で述べられる。これらの配列および下述の方法を使用して、以下の３つの追加的Δ１２デサチュラーゼがここで本出願人らによって同定された。クリヴェロミセス・ラクチス（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ ｌａｃｔｉｓ）ｇｎｌ｜ＧＬＶ｜ＫＬＬＡ０Ｂ００４７３ｇＯＲＦ（配列番号４８）、カンジダ・アルビカンス（Ｃａｎｄｉｄａ ａｌｂｉｃａｎｓ）ジェンバンク登録番号ＥＡＫ９４９５５（配列番号４９）、およびデバリオミセス・ハンセニ（Ｄｅｂａｒｙｏｍｙｃｅｓ ｈａｎｓｅｎｉｉ）ＣＢＳ７６７ジェンバンク登録番号ＣＡＧ９０２３７（配列番号５００）。ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）におけるこれらの追加的Δ１２デサチュラーゼのいずれかの過剰発現は、ＬＡ生成を増大させる手段として有用であることができ、それによってその他の下流ＰＵＦＡ（例えばＤＨＡ）の生成増大を可能にする。

【０２２８】

別の好ましい実施形態では、Ｆ．モニリフォルメ（ｍｏｎｉｌｉｆｏｒｍｅ）（配列番号５１および５２）は以前から知られているΔ１５デサチュラーゼと比べていくつかのユニークな特性を有するので、この特定のΔ１５デサチュラーゼは、ＡＬＡ生成を増大させる好ましいΔ１５デサチュラーゼである。第一に、Ｆ．モニリフォルメ（ｍｏｎｉｌｉｆｏｒｍｅ）Δ１５デサチュラーゼは、その顕著なΔ１２デサチュラーゼ活性によって区別される（したがって酵素を二機能として特徴づける）。以前の研究では、配列番号５２をコードするキメラ遺伝子で形質転換されたヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）のΔ１２デサチュラーゼ中断株が、９６％のＬＡをＡＬＡに変換（％基質変換は［１８：３］／［１８：２＋１８：３］×１００として計算される）したのに加えて、２４％のオレイン酸をＬＡに変換できた（％基質変換は（［１８：２＋１８：３］／［１８：１＋１８：２＋１８：３］）×１００として計算される）と判定されている。第二に、Ｆ．モニリフォルメ（ｍｏｎｉｌｉｆｏｒｍｅ）Δ１５デサチュラーゼは、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中で発現すると、その他の異種発現されたΔ１５デサチュラーゼについて述べられたものと比べて（例えば非油性酵母サッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中でＣ．エレガンス（ｅｌｅｇａｎｓ）Δ１５デサチュラーゼを発現した際のＡＬＡ％生成物蓄積はわずか４．１％であった（ミーサピオドスク（Ｍｅｅｓａｐｙｏｄｓｕｋ）ら著、Ｂｉｏｃｈｅｍ．３９：１１９４８～１１９５４頁（２０００年））、ＡＬＡの非常に高い合成を可能にする［すなわち配列番号５２をコードするキメラ遺伝子で形質転換されたＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）は、形質転換宿主細胞において、全脂肪酸に対して３１％のＡＬＡ％生成物蓄積を実証でき、それは８３％のＡＬＡ変換効率に等しい（［１８：３］／［１８：２＋１８：３］×１００として計算される）］一方、アブラナ（Ｂ．ｎａｐｕｓ）Δ１５デサチュラーゼをＳ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中で発現させると、ＡＬＡの％生成物蓄積はわずか１．３％であった（リード（Ｒｅｅｄ），Ｄ．Ｗ．ら著、Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ．１２２：７１５～７２０頁（２０００年））。最後に、Ｆ．モニリフォルメ（ｍｏｎｉｌｉｆｏｒｍｅ）Δ１５酵素は、下流の１８：２のω－６誘導体に対して比較的幅広い基質特異性を有する。具体的にはΔ１５デサチュラーゼは、ＧＬＡからＳＴＡ、ＤＧＬＡからＥＴＡ、およびＡＲＡからＥＰＡへの変換を触媒できる。

【０２２９】

好ましいΔ１５デサチュラーゼとしての現行のＦ．モニリフォルメ（ｍｏｎｉｌｉｆｏｒｍｅ）Δ１５酵素の同定にもかかわらず、最近、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）において、おそらく改善された効率で機能できる新し

い６つのΔ１５デサチュラーゼが同定されている。具体的には、サッカロミセス・クリヴェリ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｋｌｕｙｖｅｒｉ）Δ１５デサチュラーゼ（ジェンバンク登録番号ＢＡＤ１１９５２、Ｓｋｄ１５）についてオオウラ（Ｏｕｒａ）ら著、Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．１５０：１９８３～１９９０頁（２００４年）で述べられる一方、モルティエラ・アルピナ（Ｍｏｒｔｉｅｒｅｌｌａ ａｌｐｉｎａ）（ジェンバンク登録番号ＡＢ１８２１６３、Ｍａｄ１５）からのものについてはサクラダニ（Ｓａｋｕｒａｄａｎｉ）ら著、「Ａｐｐｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．」６６：６４８～６５４頁（２００５年）て述べられる。どちらの配列もそれぞれ以前同定されたＳ．クリヴェリ（ｋｌｕｙｖｅｒｉ）およびＭ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）Δ１２デサチュラーゼに対するそれらの近い相同性に基づいて部分的に同定され、それらの機能活性の決定がそれに続いたので、これらの２対のタンパク質は、フザリウム・モニリフォルメ（Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｍｏｎｉｌｉｆｏｒｍｅ）、アスペルギルス・ニデュランス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｄｕｌａｎｓ）、マグナポルテ・グリセア（Ｍａｇｎａｐｏｒｔｈｅ ｇｒｉｓｅａ）、ニューロスポラ・クラッサ（Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ ｃｒａｓｓａ）、およびフザリウム・グラミネアリウム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｇｒａｍｉｎｅａｒｉｕｍ）（上の表参照）のものと同様に、近縁関係にある真菌Δ１２およびΔ１５デサチュラーゼの追加的な例を提供した。この発見は、真菌Δ１２デサチュラーゼ様配列の「対」が、Δ１５デサチュラーゼ活性を有する１つのタンパク質およびΔ１２デサチュラーゼ活性を有する１つのタンパク質を含んでなると思われるという本出願人らの以前の仮説（国際公開第２００５／０４７４８０号パンフレットおよび国際公開第２００５／０４７４８５号パンフレット参照）に追加的な支持を提供した。このようにして同様のΔ１２デサチュラーゼ様タンパク質の「対」が、クリヴェロミセス・ラクチス（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ ｌａｃｔｉｓ）、カンジダ・アルビカンス（Ｃａｎｄｉｄａ ａｌｂｉｃａｎｓ）、デバリオミセス・ハンセニ（Ｄｅｂａｒｙｏｍｙｃｅｓ ｈａｎｓｅｎｉｉ）ＣＢＳ７６７、およびアスペルギルス・フミガーツス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｆｕｍｉｇａｔｕｓ）においてここで同定され、予測されたように各対の１つのメンバーは以前同定されたＳ．クリヴェリ（ｋｌｕｙｖｅｒｉ）Δ１２デサチュラーゼ（Ｓｋｄ１２）により近く整列し、およびもう１つはＳｋｄ１５により近く整列した（図３Ａ）。したがってこの分析に基づいて、本出願人らは、Ｋ．ラクチス（ｌａｃｔｉｓ）ジェンバンク登録番号ＸＭ＿４５１５５１、Ｄ．ハンセニ（ｈａｎｓｅｎｉｉ）ＣＢＳ７６７ジェンバンク登録番号ＣＡＧ８８１８２、Ｃ．アルビカンス（ａｌｂｉｃａｎｓ）ジェンバンク登録番号ＥＡＬ０３４９３、およびＡ．フミガーツス（ｆｕｍｉｇａｔｕｓ）ジェンバンク登録番号ＥＡＬ８５７３３を、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）におけるその過剰発現がω－３脂肪酸の生成を増大するのに有用であることができる、推定上の真菌Δ１５デサチュラーゼとして同定した。

【０２３０】

追加的な実施形態では、本出願人らは、Δ１２デサチュラーゼ活性とは対照的に、Δ１５デサチュラーゼ活性を有する真菌配列を容易に区別する手段を同定した。具体的にはＭａｄ１２、Ｓｋｄ１２、Ｎｃｄ１２、Ｆｍｄ１２、Ｍｇｄ１２、Ａｎｄ１２、Ｆｇｄ１２、Ｄｈｄ１２ｐ、Ｋｌｄ１２ｐ、Ｃａｄ１２ｐ、Ａｆｄ１２ｐ、Ｍａｄ１５、Ｓｋｄ１５、Ｎｃｄ１５、Ｆｍｄ１５、Ｍｇｄ１５、Ａｎｄ１５、Ｆｇｄ１５、Ｄｈｄ１５ｐ、Ｋｌｄ１５ｐ、Ｃａｄ１５ｐ、およびＡｆｄ１５ｐを含んでなるアミノ酸アラインメントを分析すると（上の表参照）、真菌Δ１５またはΔ１２デサチュラーゼの全てがＦｍ ｄ１５（配列番号５２）の１０２位に対応する位置に、ＩｌｅまたはＶａｌアミノ酸残基のどちらかをそれぞれ含有し、それは高度に保存されたＨｉｓ Ｂｏｘ １（「ＨＥＣＧＨ」、配列番号２２２）からアミノ酸残基わずか３個分離れた位置であることが明らかになった（表６）。

【０２３１】

【表１６】

表6

真菌Δ12およびΔ15デサチュラーゼの保存His Box 1周辺のアミノ酸アラインメント

対応アミノ酸残基	モチーフ	デサチュラーゼ
配列番号45の107～118	ＷＶＬＡＨＥＣＧＨＱＳＦ	Mad12
配列番号46の116～127	ＷＶＬＡＨＥＣＧＨＱＡＦ	Skd12
配列番号41の153～164	ＷＶＬＡＨＥＣＧＨＱＡＦ	Nc d12
配列番号33の149～160	ＷＶＩＡＨＥＣＧＨＧＡＦ	Fm d12
配列番号39の160～171	ＷＶＬＡＨＥＣＧＨＱＡＦ	Mg d12
配列番号35の143～154	ＷＶＬＡＨＥＣＧＨＱＡＦ	An d12
配列番号43の130～141	ＷＶＩＡＨＥＣＧＨＧＡＦ	Fg d12
配列番号48の106～117	ＷＶＬＡＨＥＣＧＨＱＡＦ	Kld12p
配列番号49の135～146	ＷＶＬＡＨＥＣＧＨＱＡＦ	Cad12p
配列番号50の120～131	ＷＶＬＡＨＥＣＧＨＱＡＦ	Dhd12p
配列番号37の142～153	ＷＶＬＡＨＥＣＧＨＱＡＦ	Afd12p
配列番号62の105～116	ＷＩＬＡＨＥＣＧＨＧＡＦ	Mad15
配列番号66の117～128	ＷＩＬＡＨＥＣＧＨＳＡＦ	Skd15
配列番号58の119～130	ＷＩＬＡＨＥＣＧＨＧＡＦ	Nc d15
配列番号52の101～112	ＷＩＬＧＨＥＣＧＨＧＡＦ	Fm d15
配列番号56の95～106	ＷＩＬＡＨＥＣＧＨＧＡＦ	Mg d15
配列番号54の88～99	ＷＩＬＡＨＥＣＧＨＧＡＦ	An d15
配列番号60の101～112	ＷＩＬＧＨＥＣＧＨＧＡＦ	Fg d15
配列番号64の117～128	ＷＩＬＡＨＥＣＧＨＧＡＦ	Kld15p
配列番号65の130～141	ＷＩＬＡＨＥＣＧＨＧＡＦ	Cad15p
配列番号67の132～143	ＷＩＬＡＨＥＣＧＨＧＡＦ	Dhd15p
配列番号68の94～105	ＷＩＬＡＨＥＣＧＨＧＡＦ	Afd15p

【０２３２】

本出願人らは、真菌デサチュラーゼにおいて、この位置のＩｌｅおよびＶａｌは、それぞれΔ１５およびΔ１２デサチュラーゼ特異性の決定因子であると結論する。より具体的には本出願人らは、対応残基にＩｌｅがあるあらゆる真菌Δ１２デサチュラーゼ様タンパク質（すなわち、またはモチーフＩＸＸＨＥＣＧＨ［配列番号２２３］）はΔ１５デサチュラーゼであることを特徴とし、対応残基にＶａｌがあるあらゆる真菌Δ１２デサチュラーゼ様タンパク質（すなわち、またはモチーフＶＸＸＨＥＣＧＨ［配列番号２２４］）はΔ１２デサチュラーゼを特徴とすることを提案する。したがってこの単一ロイシン／バリンアミノ酸は、将来の真菌デサチュラーゼを同定および注釈するときに、重要な残基とみなされる。さらに真菌Δ１２デサチュラーゼ様タンパク質をコードする遺伝子（例えばここで配列番号５２として述べられるフザリウム・モニリフォルメ（Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｍｏｎｉｌｉｆｏｒｍｅ）デサチュラーゼ）において、この位置でのＩｌｅからＶａｌへの変化をもたらす突然変異が、Δ１２不飽和化などに向けた酵素特異性を変化させることが考察され、反対にこの位置でのＶａｌからＩｌｅへの変化もたらす突然変異は、Δ１５不飽和化などに向けた酵素特異性を変化させることが考察される。

【０２３３】

好ましい実施形態では、利用する特定の経路次第で、ＤＨＡ生産のために宿主細胞中で発現するのに最も有利であるとして、様々なΔ５デサチュラーゼを選択してもよい。具体的には、ω－６Δ６デサチュラーゼ／Δ６エロンガーゼ経路またはω－６Δ９エロンガーゼ／Δ８デサチュラーゼ経路を発現する場合は、Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）、Ｉ．ガルバナ（ｇａｌｂａｎａ）、およびヒト（Ｈ．ｓａｐｉｅｎｓ）Δ５デサチュラーゼが好ましい。対照的にω－３Δ６デサチュラーゼ／Δ６エロンガーゼ経路またはω－３Δ９エ

ロンガーゼ／Δ８デサチュラーゼ経路を利用する（それによってω－３ＰＵＦＡの合成に有利にする）ことが望ましい場合には、フィトフトラ・メガスペルマ（Ｐｈｙｔｏｐｈｔｈｏｒａ　ｍｅｇａｓｐｅｒｍａ）またはゼブラフィッシュ（Ｄａｎｉｏ　ｒｅｒｉｏ）からのものなどのω－３を好むΔ５デサチュラーゼを利用することが有利かもしれない。ヘースティングス（Ｈａｓｔｉｎｇｓ）らは、サッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）におけるゼブラフィッシュ（Ｄａｎｉｏ　ｒｅｒｉｏ）ｃＤＮＡ（ジェンバンク登録番号ＡＦ３０９５５６）の発現が、ω－６基質と比べてω－３に対する明確な好みがあり、Δ５デサチュラーゼ活性よりもわずかに高いΔ６デサチュラーゼ活性がある、二機能Δ６およびΔ５デサチュラーゼ活性を示すことを初めて報告した。引き続いて本出願人らは、ＯＲＦの９８４位における１ｂｐ（Ｔ）の欠失（ヌル突然変異をもたらす）および１１７１位における１ｂｐの変化（ＧからＡ）（ＶからＭへのアミノ酸変化をもたらす）だけが異なるジェンバンク登録番号ＡＦ３０９５５６の相同体として、ジェンバンク登録番号ＢＣ０６８２２４を同定した。次にジェンバンク登録番号ＢＣ０６８２２４のＶ１１７１Ｍ突然変異以外は、ジェンバンク登録番号ＡＦ３０９５５６と同一の突然変異タンパク質（ここで「Ｄｒｄ６／ｄ５（Ｍ）」として同定される）を作り出した。ここで本出願人らによる予備研究は、Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）におけるＤｒｄ６／ｄ５（Ｍ）の発現がジェンバンク登録番号ＡＦ３０９５５６よりも約５０％低い活性を示したと判定したが、ＥＴＡを作るヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）株における発現は、二機能Δ５／Δ６デサチュラーゼがω－３特異的であることを確認した。したがってω－３ＰＵＦＡの合成増大のためには、ω－３Δ６デサチュラーゼ／Δ６エロンガーゼ経路またはω－３Δ９エロンガーゼ／Δ８デサチュラーゼ経路のいずれかの発現に際して、この酵素（ここで配列番号１８として同定される）または同様の基質特異性があるものが望ましい。

【０２３４】

もちろん本発明の代案の実施形態では、配列番号２、５、７、９、１２、１５、１８、２０、２３、２６、２９、３１、３３、３５～３７、３９、４１、４３、４５、４６、４８～５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４～６８、７０、７８、８４、８７、９５、９８、１０１、および１０５によってコードされるデサチュラーゼおよびエロンガーゼと実質的に同一のその他のＤＮＡもまた、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）におけるＤＨＡ生産のために使用できる。「実質的に同一の」とは、増大する好ましさの順で、選択されるポリペプチド、またはアミノ酸配列をコードする核酸配列と少なくとも８０％、９０％または９５％の相同性を示すアミノ酸配列または核酸配列を意図する。ポリペプチドでは、比較配列の長さは一般に、少なくとも１６個のアミノ酸、好ましくは少なくとも２０個のアミノ酸または最も好ましくは３５個のアミノ酸である。核酸では、比較配列の長さは一般に、少なくとも５０個のヌクレオチド、好ましくは少なくとも６０個のヌクレオチド、より好ましくは少なくとも７５個のヌクレオチド、そして最も好ましくは１１０個のヌクレオチドである。

【０２３５】

相同性は、典型的に配列分析ソフトウェアを使用して測定され、「配列分析ソフトウェア」と言う用語は、ヌクレオチドまたはアミノ酸配列の分析のために有用なあらゆるコンピュータアルゴリズムまたはソフトウェアプログラムを指す。「配列分析ソフトウェア」は、市販のものでも、あるいは独立して開発されてもよい。典型的な配列分析ソフトウェアとしては、１．）ウィスコンシン州マディソンのジェネティック・コンピュータ・グループ（Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　Ｃｏｍｐｕｔｅｒ　Ｇｒｏｕｐ（ＧＣＧ）（Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ））からのＧＣＧパッケージプログラム、ウィスコンシン・パッケージ（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ　Ｐａｃｋａｇｅ）バージョン９．０、２．）ＢＬＡＳＴＰ、ＢＬＡＳＴＮ、ＢＬＡＳＴＸ（アルトシュール（Ａｌｔｓｃｈｕｌ）ら著、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３～４１０頁（１９９０年））、３．）ウィスコンシン州マディソンのＤＮＡＳＴＡＲ（ＤＮＡＳＴＡＲ，Ｉｎｃ．（Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ））からのＤＮＡＳＴＡＲ、および４．）スミス－ウォーターマン・アルゴリズムを組み入れたＦＡＳＴＡプログラム（

Ｗ．Ｒ．ピアソン（Ｐｅａｒｓｏｎ）著、Ｃｏｍｐｕｔ．Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓ．［Ｐｒｏｃ．Ｉｎｔ．Ｓｙｍｐ．］（１９９４年）、１９９２年会議、１１１～２０頁、スハイ，サンドル（Ｓｕｈａｉ，Ｓａｎｄｏｒ）編、Ｐｌｅｎｕｍ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＮＹ）が挙げられるが、これに限定されるものではない。本願明細書の文脈内では、配列分析ソフトウェアを分析のために使用する場合、分析結果は特に断りのない限り、言及されるプログラムの「デフォルト値」に基づくものと理解される。ここでの用法では、「デフォルト値」とは、最初に初期化されるときにソフトウェアに最初にロードされる、あらゆる値またはパラメータの組を意味する。一般に、このようなコンピューターソフトウェアは、様々な置換、欠失、およびその他の修正に相同性の程度を割り当てて同様の配列を対応させる。

【０２３６】

より好ましい実施形態では、配列番号２、９、１２、２０、２３、２６、７０、７８、８４、１０１および１０５で述べられるものと実質的に同一のデサチュラーゼおよびエロンガーゼをコードするコドン最適化遺伝子が利用される。具体的には当業者によく知られているように、選択される宿主微生物中での最適遺伝子発現のためのコドンで天然遺伝子中のコドンを置換して、コードされるｍＲＮＡの翻訳効率を増大させることで、異種の遺伝子の発現を増大できる。したがって変性ポリペプチドが代案の宿主に好まれるコドンを使用するように、異種宿主中で発現する特定のポリペプチドをコードするコドン部分を修正することが有用であることが多く、宿主が好むコドンの使用は、ポリペプチドをコードする外来性遺伝子の発現を実質的に増強できる。

【０２３７】

一般に宿主が好むコドンは、タンパク質（好ましくは最大量で発現するもの）中でのコドン使用を調べ、どれが最高頻度で使用されるかを判定することにより、関心のある特定の宿主種内で判定できる。次に宿主種で好まれるコドンを使用して、関心のあるポリペプチド（例えばデサチュラーゼ、エロンガーゼ、アシルトランスフェラーゼ）のコード配列を全部または部分的に合成できる。ＤＮＡの全部（または一部）はまた、転写ｍＲＮＡ中に存在するあらゆる不安定化配列または二次構造領域を除去するように合成できる。そして、ＤＮＡの全部（または一部）はまた、塩基組成を所望の宿主細胞中でより好まれるものに改変するように合成できる。

【０２３８】

さらに翻訳開始コドン「ＡＴＧ」を取り囲むヌクレオチド配列が、酵母菌細胞中の発現に影響することが分かっている。所望のポリペプチドの酵母菌中での発現が不良であれば、外来性遺伝子のヌクレオチド配列を修正して効率的な酵母菌翻訳開始配列を含めさせ、最適の遺伝子発現を得ることができる。酵母菌中での発現のために、これは非効率的に発現する遺伝子を内在性酵母菌遺伝子、好ましくは高度に発現する遺伝子にインフレームで融合させることによる部位特異的変異誘発によって実施できる。代案としてはここでヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）について実証されるように、宿主中の共通翻訳開始配列を判定して、関心のある宿主中でのそれらの最適発現のために、この配列を異種性遺伝子内に組換えできる。

【０２３９】

本発明では、上述の宿主の好みに基づいて、表５からのいくつかのデサチュラーゼおよびエロンガーゼ遺伝子がヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中での発現のためにコドン最適化された。これは最初にＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）コドン使用頻度プロフィールを判定し（国際公開第０４／１０１７５７号パンフレット参照）、好ましいコドンを同定することで可能であった。次にＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中での遺伝子発現をさらに最適化するために、「ＡＴＧ」開始コドン周辺の共通配列を判定した（すなわち「ＭＡＭＭＡＴＧＮＨＳ」（配列番号１５５）、ここで使用した核酸縮重コードは次のとおり。Ｍ＝Ａ／Ｃ、Ｓ＝Ｃ／Ｇ、Ｈ＝Ａ／Ｃ／Ｔ、およびＮ＝Ａ／Ｃ／Ｇ／Ｔ）。下の表７は、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中で発現した際の天然遺伝子とコドン最適化遺伝子の活性を比較し、各コ

ドン最適化遺伝子に関する詳細を提供する。％Ｓｕｂ．Ｃｏｎｖ．は「％基質変換」の略語であり、Ｃｏｄｏｎ－Ｏｐｔ．は「コドン最適化」の略語である。

【０２４０】

【表１７】

表7

ヤロウィア・リポリティカにおけるDHA生合成に

最も好ましいコドン最適化デサチュラーゼおよびエロンガーゼ

天然遺伝子	天然遺伝子%基質変換	コドン最適化遺伝子中で変性した全塩基	コドン最適化遺伝子%基質変換	参考文献	コドン最適化配列番号
M.アルピナΔ6デサチュラーゼ（ジェンバンク登録番号AF465281）	30%	152～1374bp（144個のコドンに対応する）	42%	国際公開第04/101753号パンフレット	3
M.アルピナ高親和力$C_{18/20}$エロンガーゼ（ジェンバンク登録番号AX464731）	30%	94～957bp（85個のコドンに対応する）	47%	国際公開第04/101753号パンフレット	24
T.アウレウム（aureum）$C_{18/20}$エロンガーゼ（「ELO2」）	33%	114～817bp（108個のコドンに対応する）	46%	-	27
S.ディクリナΔ17デサチュラーゼ（米国特許出願公開第2003/0196217A1号明細書）	23%	127～1077bp（117個のコドンに対応する）	45%	同時係属米国特許出願第10/840478号明細書	19
イソクリシス・ガルバナΔ9エロンガーゼ	-	126～789bp（123個のコドンに対応する）	30%	-	71
ミドリムシΔ8デサチュラーゼ	-	207of1263bp（192個のコドンに対応する）	75%	同時係属米国特許出願第11/166993号明細書	81
イソクリシス・ガルバナΔ5デサチュラーゼ	7%	203～1323bp（193個のコドンに対応する）	32%	-	10
ヒトΔ5デサチュラーゼ（ジェンバンク登録番号NP_037534）	-	227of1335bp（207個のコドンに対応する）	30%	-	13
スラウストキトリウム・アウレウムΔ4デサチュラーゼ	-	170～1545bp（166個のコドンに対応する）	20%	-	106
オストレオコッカス・タウリ$C_{20/22}$エロンガーゼ	-	160～903bp（147個のコドンに対応する）	67%	-	102
ドブネズミ$C_{16/18}$エロンガーゼ（ジェンバンク登録番号AB071986）	-	127～792bp（125個のコドンに対応する）	43%	-	85

【０２４１】

本発明の追加的な代案の実施形態では、配列番号３、１０、１３、１９、２４、２７、７１、８１、８５、１０２、および１０６５として表される好ましいデサチュラーゼおよびエロンガーゼと実質的に同一でない、その他のＤＮＡもまた、ここでの目的のために使用できる。例えば本発明の教示に従ったヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中への導入に有用なΔ６デサチュラーゼポリペプチドをコードするＤＮＡ配列は、ＧＬＡまたはＳＴＡを生成する能力を有する微生物から得られてもよい。このような微生物としては、例えばモルティエラ（Ｍｏｒｔｉｅｒｅｌｌａ）、コニディオボルス（Ｃｏｎｉｄｉｏｂｏｌｕｓ）、ピシウム（Ｐｙｔｈｉｕｍ）、フィトファトラ（Ｐｈｙｔｏｐｈａｔｈｏｒａ）、ペニシリウム（Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ）、チノリモ（Ｐｏｒｐｈｙｒｉｄｉｕｍ）、コイドスポリウム（Ｃｏｉｄｏｓｐｏｒｉｕｍ）、ケカビ（Ｍｕｃｏｒ）、フザリウム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ）、アスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）、ロドトルラ（Ｒｈｏｄｏｔｏｒｕｌａ）、およびハエカビ（Ｅｎｔｏｍｏｐｈｔｈｏｒａ）属に属するものが挙げられる。チノリモ（Ｐｏｒｐｈｙｒｉｄｉｕｍ）属内で特に興味深いのは、Ｐ．クルエンタム（ｃｒｕｅｎｔｕｍ）である。モルティエラ（Ｍｏｒｔｉｅｒｅｌｌａ）属内で特に興味深いのは、Ｍ．エロンガータ（ｅｌｏｎｇａｔａ）、Ｍ．エクシグア（ｅｘｉｇｕａ）、Ｍ．ハイグロフィラ（ｈｙｇｒｏｐｈｉｌａ）、Ｍ．ラマニアナ（ｒａｍａｎｎｉａｎａ）アングリスポラ（ａｎｇｕｌｉｓｐｏｒａ）変種、およびＭ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）である。ケカビ（Ｍｕｃｏｒ）属内で特に興味深いのは、Ｍ．シルシネロイデス（ｃｉｒｃｉｎｅｌｌｏｉｄｅｓ）およびＭ．ジャバニカス（ｊａｖａｎｉｃｕｓ）である。

【０２４２】

代案としては、例えばＭ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）Δ６デサチュラーゼと実質的に同一でないが、分子のカルボキシル末端から６個めの炭素で脂肪酸分子を不飽和化できる関連デサチュラーゼもまた、デサチュラーゼがなおもＬＡをＧＬＡにおよび／またはＡＬＡをＳＴＡに効果的に変換できると仮定すれば、本発明においてΔ６デサチュラーゼとして有用であろう。したがって関連デサチュラーゼおよびエロンガーゼは、ここで開示されるデサチュラーゼおよびエロンガーゼと実質的に同一に機能するそれらの能力によって同定できる（または作り出せる）。

【０２４３】

上で提案されたように、別の実施形態では、当業者は例えばここでの目的に適切なΔ１２デサチュラーゼおよびΔ６デサチュラーゼ活性の双方を有する融合タンパク質を作り出せる。これは隣接するリンカーと共にΔ１２デサチュラーゼおよびΔ６デサチュラーゼを一緒に融合することで可能である。Δ１２デサチュラーゼまたはΔ６デサチュラーゼのどちらかが、融合タンパク質のＮ－末端部分にあることができる。適切なリンカー分子をデザインおよび合成する手段は、当業者によって容易に知られており、例えばリンカーはひと続きのアラニンまたはリジンアミノ酸であることができ、融合酵素の活性に影響しない。

【０２４４】

最後に、配列を合成し、配列を一緒にまとめる方法は、文献においてよく確立されていることが技術分野で知られている。したがって生体外（ｉｎ ｖｉｔｒｏ）での変異誘発および選択、部位特異的変異誘発、化学的突然変異誘発、「遺伝子シャフリング」法またはその他の手段を用いて、天然由来デサチュラーゼおよび／またはエロンガーゼ遺伝子の変異を得ることができる。これによって生体内（ｉｎ ｖｉｖｏ）でそれぞれデサチュラーゼまたはエロンガーゼ活性を有し、宿主細胞中での機能により望ましい物理的および動力学的パラメーター（例えばより長い半減期または所望のＰＵＦＡのより高速の生成）がある、ポリペプチドの生成が可能になる。

【０２４５】

要約すると、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）におけるＤＨＡ生産に適したＰＵＦＡ生合成経路酵素をコードする好ましいデサチュラーゼおよびエロンガーゼ遺伝子の配列が提示されるが、これらの遺伝子は、ここでの本発明

を制限することを意図しない。多様な供給源から、ここでの目的に適したＰＵＦＡ生合成経路酵素をコードする多数のその他の遺伝子が単離できる（例えば適切なデサチュラーゼまたはエロンガーゼ活性を有する野生型、コドン最適化された、合成および／または突然変異酵素）。これらの代案のデサチュラーゼは、次の能力によって特徴づけられる。１．）分子のカルボキシル末端から数えて１７番目および１８番目の炭素原子間で脂肪酸を不飽和化し、ＡＲＡからＥＰＡおよびＤＧＬＡからＥＴＡへの変換を触媒する（Δ１７デサチュラーゼ）、２．）ＬＡからＧＬＡおよび／またはＡＬＡからＳＴＡへの変換を触媒する（Δ６デサチュラーゼ）、３．）ＤＧＬＡからＡＲＡおよび／またはＥＴＡからＥＰＡへの変換を触媒する（Δ５デサチュラーゼ）、４．）オレイン酸からＬＡへの変換を触媒する（Δ１２デサチュラーゼ）、５．）ＬＡからＡＬＡへの変換を触媒する（Δ１５デサチュラーゼ）、６．）ＥＤＡからＤＧＬＡおよび／またはＥＴｒＡからＥＴＡへの変換を触媒する（Δ８デサチュラーゼ）、７．）ＤＰＡからＤＨＡへの変換を触媒する（Δ４デサチュラーゼ）、および／または８．）パルミチン酸からパルミトレイン酸、および／またはステアリン酸からオレイン酸への変換を触媒する（Δ９デサチュラーゼ）。同様にして、ここでの目的のための適切なエロンガーゼは特定源からのものに限定されない。それよりもここでの目的に役立つ酵素は、エロンガーゼが作用する基質と比べて脂肪酸炭素鎖を炭素２個分延長し、それによって一価または多価不飽和脂肪酸を生じるそれらの能力によって特徴づけられる。より具体的にはこれらのエロンガーゼは、次の能力によって特徴づけられる。１．）ＬＡをＥＤＡにおよび／またはＡＬＡをＥＴｒＡに延長する（Δ９エロンガーゼ）、２．）Ｃ１８基質を延長してＣ２０生成物を生成する（$C_{18/20}$エロンガーゼ）、３．）Ｃ１４基質を延長してＣ１６生成物を生成する（$C_{14/16}$エロンガーゼ）、４．）Ｃ１６基質を延長してＣ１８生成物を生成する（$C_{16/18}$エロンガーゼ)、および／または５．）Ｃ２０基質を延長してＣ２２生成物を生成する（$C_{20/22}$エロンガーゼ)。ここでも幅広い基質特異性の結果として、エロンガーゼによっては、いくつかのエロンガーゼ反応を触媒できてもよいことに留意することが重要である。

【０２４６】

アシルトランスフェラーゼおよびＴＡＧ生合成終末ステップにおけるそれらの役割

アシルトランスフェラーゼは、ＴＡＧの生合成に深く関与する。ＴＡＧ合成をもたらす関与遺伝子および代謝中間体に関する詳細を含む、酵母菌におけるＴＡＧ生合成に関する２つの包括的なミニレビューは、Ｄ．ソルガー（Ｓｏｒｇｅｒ）およびＧ．ダウム（Ｄａｕｍ）著、「Ａｐｐｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．」６１：２８９～２９９頁（２００３年）、およびＨ．ミュルナー（Ｍｕｅｌｌｎｅｒ）およびＧ．ダウム（Ｄａｕｍ）著、Ａｃｔａ Ｂｉｏｃｈｉｍｉｃａ Ｐｏｌｏｎｉｃａ、５１（２）：３２３～３４７頁（２００４年）である。これらのレビューの著者らは、真核生物アシルトランスフェラーゼ遺伝子ファミリー（下記）の異なるクラスを明確に要約するが、脂質粒子におけるＴＡＧ合成および中性脂質形成の調節側面についてほとんど分かっていないこともまた認める。

【０２４７】

中性脂質合成をもたらすアシル－ＣｏＡ－依存または非依存エステル化反応に関与する、４つの真核生物のアシルトランスフェラーゼ遺伝子ファミリーが同定されている。

（１）アシル－ＣｏＡ：コレステロールアシルトランスフェラーゼ（ＡＣＡＴ）ファミリー、ＥＣ２．３．１．２６（ステロールアシルトランスフェラーゼとして一般的に知られている）。この遺伝子ファミリーとしては、アシル－ＣｏＡおよびステロールからＣｏＡおよびステロールエステルへの変換に関与する酵素が挙げられる。このファミリーとしてはまた、ＴＡＧ生合成の終末ステップに関与するＤＧＡＴ１も挙げられる。

（２）レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ（ＬＣＡＴ）ファミリー、ＥＣ２．３．１．４３。この遺伝子ファミリーは、ホスファチジルコリンおよびステロールからステロールエステルおよび１－アシルグリセロホスホコリンへの変換に関与する。このファミリーとしてはまた、ＴＡＧ生合成をもたらすリン脂質のｓｎ－２位から１，２－ジアシルグリセロールのｓｎ－３位へのアシル基転移に関与する、リン脂質：ジアシルグ

リセロールアシルトランスフェラーゼ（ＰＤＡＴ）酵素も挙げられる。
（３）ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ（ＤＡＧ　ＡＴ）ファミリー、ＥＣ２．３．１．２０。（ＤＧＡＴ２をはじめとする）この遺伝子ファミリーは、ＴＡＧ生合成の終末ステップに関与する。
（４）グリセロール－３－リン酸アシルトランスフェラーゼおよびアシル－ＣｏＡリゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ（ＧＰＡＴ／ＬＰＡＡＴ）ファミリー。ＧＰＡＴ（Ｅ．Ｃ．２．３．１．１５）タンパク質がＴＡＧ生合成の第１のステップに関与するのに対し、ＬＰＡＡＴ（Ｅ．Ｃ．２．３．１．５１）酵素はＴＡＧ生合成の第２のステップに関与する。このファミリーとしてはまた、リン脂質とＣｏＡの間のアシル交換を触媒するリゾホスファチジルコリンアシルトランスフェラーゼ（ＬＰＣＡＴ）が挙げられる。

【０２４８】
これらの４つのアシルトランスフェラーゼ遺伝子ファミリーは一緒になって、中性脂質形成のための重複する生合成システムを表し、分別制御、代案の局在化、および異なる基質特異性（Ｈ．ミュルナー（Ｍｕｅｌｌｎｅｒ）およびＧ．ダウム（Ｄａｕｍ）、前出）の結果であるように見える。これらの４つの各遺伝子ファミリーについて、５％を超えるＤＨＡの合成を可能にするヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中での代謝エンジニアリングに対するそれらの重要性に基づいてここで論じる。

【０２４９】
様々なアシルトランスフェラーゼの機能性
ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中でのこれらのアシルトランスフェラーゼの多くの間の相互作用を図４に概略的に示す。最初にＴＡＧ生合成の直接的機序に注目すると、このプロセスにおける第１のステップは、リゾホスファチジン酸（ＬＰＡ）（および副産物としてＣｏＡ）を生成する、ＧＰＡＴを経由する、１分子のアシル－ＣｏＡからｓｎ－グリセロール－３－リン酸へのエステル化である。次にＬＰＡＡＴによって触媒される反応である、アシル－ＣｏＡの第２の分子のエステル化によって、リゾホスファチジン酸がホスファチジン酸（ＰＡ）（および副産物としてＣｏＡ）に変換される。次にホスファチジン酸ホスファターゼは、ホスファチジン酸からのリン酸基の除去に関与して、１，２－ジアシルグリセロール（ＤＡＧ）を生じる。そして、最終的にＤＡＧ　ＡＴ（例えばＤＧＡＴ１、ＤＧＡＴ２またはＰＤＡＴ）によって第３の脂肪酸がＤＡＧのｓｎ－３位に付加されて、ＴＡＧが形成する。

【０２５０】
歴史的にＤＧＡＴ１は、アシル－ＣｏＡ基がＤＡＧに転移されてＴＡＧを形成する、アシル－ＣｏＡおよびＤＡＧからＴＡＧおよびＣｏＡへの変換に関与する反応を触媒する、ＴＡＧ合成に特異的に関与する唯一の酵素であると考えられてきた。ＤＧＡＴ１はＡＣＡＴと相同的であることが知られていたが、最近の研究はＡＣＡＴ遺伝子ファミリーと無関係のＤＡＧ　ＡＴ酵素の新しいファミリーを同定した。したがって命名法は今やＡＣＡＴ遺伝子ファミリー（ＤＧＡＴ１ファミリー）と関係があるＤＡＧ　ＡＴ酵素と、無関係のもの（ＤＧＡＴ２ファミリー）との間で区別する（ラルディサバル（Ｌａｒｄｉｚａｂａｌ）ら著、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７６（４２）：３８８６２～３８８６９頁（２００１年））。真核生物の全ての主要な門（真菌、植物、動物、および基底真核生物）において、ＤＧＡＴ２ファミリーのメンバーが同定されている。

【０２５１】
さらにより最近、ダルキビスト（Ｄａｈｌｑｖｉｓｔ）ら（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（ＵＳＡ）９７：６４８７～６４９２頁（２０００年））およびエルカース（Ｏｅｌｋｅｒｓ）ら（Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７５：１５６０９～１５６１２頁（２０００年））は、ＴＡＧ合成が、アシル－ＣｏＡ不在下でもアシル－ＣｏＡ－非依存性機構酵素を通じて起きることができることを発見した。具体的にはＰＤＡＴがホスファチジルコリン基質のｓｎ－２位からアシル基を除去して、ＤＡＧに転移させてＴＡＧを生じる。この酵素は、構造的にＬＣＡＴファミリーと関係があり、ＰＤＡＴの機能はＤＧＡＴ

２程にはよく特性決定されていないが、ＰＤＡＴはいくつかの油料種子においてリン脂質から「異常な」脂肪酸を除去する上で主要な役割を果たすと見なされている（バナーズ（Ｂａｎａｓ），Ａ．ら著、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．Ｔｒａｎｓ．２８（６）：７０３～７０５頁（２０００年））。

【０２５２】

サッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中でのＴＡＧ合成に関して、３つの経路について述べられている（サンダガー（Ｓａｎｄａｇｅｒ），Ｌ．ら著、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７７（８）：６４７８～６４８２頁（２００２年））。まずＴＡＧは、主にＤＧＡＴ２（ＤＧＡ１遺伝子によってコードされる）の作用によって、ＤＡＧおよびアシル－ＣｏＡから合成される。しかしより最近では、ＰＤＡＴ（ＬＲＯ１遺伝子によってコードされる）もまた同定されている。最後にアシル－ＣｏＡおよびステロールを利用してステロールエステル（および少量のＴＡＧ、サンダガー（Ｓａｎｄａｇｅｒ），Ｌ．ら著、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．Ｔｒａｎｓ．２８（６）：７００～７０２頁（２０００年）参照）を生成する２つのアシル－ＣｏＡ：ステロール－アシルトランスフェラーゼ（ＡＲＥ１およびＡＲＥ２遺伝子によってコードされる）が知られている。ＰＤＡＴおよびＤＧＡＴ２を合わせると、Ｓ．セレヴィシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）油生合成のおよそ９５％に関与している。

【０２５３】

ＤＧＡＴ１、ＤＧＡＴ２、ＰＤＡＴ、およびＡＲＥ２（下記）をコードするいくつかの公的に入手できる配列に基づいて、本出願人らはヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）において、ＤＧＡＴ１（配列番号１２２）、ＤＧＡＴ２（配列番号１３０、１３２および１３４［ここで配列番号１３０は、配列番号１３２および１３４で提供される少なくとも２つの追加的入れ子ＯＲＦを含有し、配列番号１３４によってコードされるＯＲＦはその他の知られているＤＧＡＴ酵素と高度の類似性を有し、配列番号１３４中の中断は天然遺伝子のＤＧＡＴ機能を排除して、それによって配列番号１３５のポリペプチドがＤＧＡＴ機能性を有することを確認する］）、ＰＤＡＴ（配列番号１１７）、およびＡＲＥ２（配列番号１１９）をコードする遺伝子を単離して特性決定した。しかしＰＤＡＴおよびＤＧＡＴ２がおよそ９５％の油生合成に関与するＳ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中で開発されたモデルとは対照的に、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）では、ＰＤＡＴ、ＤＧＡＴ２、およびＤＧＡＴ１が約９５％までの油生合成に関与することが発見された（一方、ＡＲＥ２がさらに油生合成に対してわずかに貢献するかもしれない）。

【０２５４】

ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）のＴＡＧ画分中でのＤＨＡ蓄積において、その機能が重要であり得る最終アシルトランスフェラーゼ酵素はＬＰＣＡＴである。図４に示すように、この酵素（ＥＣ２．３．１．２３）はｓｎ－ホスファチジルコリンのｓｎ－２位における双方向アシル交換に関与して、ω－６およびω－３ＰＵＦＡ生合成を増強すると仮定される。この仮説は以下の研究に基づく。（１）スティン（Ｓｔｙｍｎｅ），Ｓ．およびＡ．Ｋ．ストバート（Ｓｔｏｂａｒｔ）は、Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｊ．２２３（２）：３０５～１４頁（１９８４年）で、ＬＰＣＡＴがアシル－ＣｏＡプールおよびホスファチジルコリン（ＰＣ）プールの間の交換に影響すると仮定した。（２）ドマーグ（Ｄｏｍｅｒｇｕｅ），Ｆ．らは、Ｊ．Ｂｉｏ．Ｃｈｅｍ ２７８：３５１１５頁（２００３年）で、ＰＣのｓｎ－２位におけるＧＬＡの蓄積、および酵母中でＡＲＡを効率的に合成できないことが、アシル－ＣｏＡプール内で起きるＰＵＦＡ生合成に伴う延長ステップの結果である一方、Δ５およびΔ６不飽和化ステップは大部分ＰＣのｓｎ－２位で起きると提案した。（３）アバディ（Ａｂｂａｄｉ），Ａ．らは、Ｔｈｅ Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ、１６：２７３４～２７４８頁（２００４年）で、遺伝子導入油料種子植物におけるＰＵＦＡ蓄積抑圧の分析に基づいて、ＬＰＣＡＴが、Δ６デサチュラーゼ／Δ６エロンガーゼ経路の成功裏の再構成において重要な役割を果たすと提案した。（４）（レンツ（Ｒｅｎｚ），Ａ．らは、国際公開第２００４／０７６６１７ Ａ２号

パンフレットで、Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中の遺伝的に導入されたΔ６デサチュラーゼ／Δ６エロンガーゼ経路において、延長効率を実質的に改善するシノラブディス・エレガンス（Ｃａｅｎｏｒｈａｂｄｉｔｉｓ　ｅｌｅｇａｎｓ）（Ｔ０６Ｅ８．１）からＬＰＣＡＴをコードする遺伝子を提供した。研究者らは、デサチュラーゼが脂質結合脂肪酸（ｓｎ－２アシルＰＣ）中の二重結合の導入を触媒する一方、エロンガーゼはＣｏＡエステル化脂肪酸（アシル－ＣｏＡ）の延長を排他的に触媒するので、ＬＰＣＡＴが、リン脂質およびアシル－ＣｏＡプール間における新たに合成された脂肪酸の効率的かつ連続的な交換を可能にしたと結論した。

【０２５５】

ＤＨＡ合成のための異種アシルトランスフェラーゼ遺伝子の選択

ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中で自然に生成されるＰＵＦＡは１８：２脂肪酸（もっと稀には１８：３脂肪酸）に限定されるので、ＧＰＡＴ、ＬＰＡＡＴ（すなわちＬＰＡＡＴ１またはＬＰＡＡＴ２）、ＤＧＡＴ１、ＤＧＡＴ２、ＰＤＡＴ、およびＬＰＣＡＴをコードする宿主生物の天然遺伝子は、１８：３およびより長い脂肪酸を含んでなるＴＡＧ（例えばＤＨＡ）を効率的に合成するのが困難であると思われる。したがって場合によっては、異種の（または「外来性」）アシルトランスフェラーゼが、天然酵素よりも好ましいかもしれない。

【０２５６】

様々な生物中で多数のアシルトランスフェラーゼ遺伝子が同定され、公共および特許文献中で開示されている。例えば以下のジェンバンク登録番号は、脂質生合成で有用な公的に入手できるアシルトランスフェラーゼ遺伝子の例を指す。ＣＱ８９１２５６、ＡＹ４４１０５７、ＡＹ３６０１７０、ＡＹ３１８７４９、ＡＹ０９３１６９、ＡＪ４２２０５４、ＡＪ３１１３５４、ＡＦ２５１７９５、Ｙ００７７１、Ｍ７７００３（ＧＰＡＴ）；Ｑ９３８４１、Ｑ２２２６７、Ｑ９９９４３、Ｏ１５１２０、Ｑ９ＮＲＺ７、Ｑ９ＮＲＺ５、Ｑ９ＮＵＱ２、Ｏ３５０８３、Ｑ９Ｄ１Ｅ８、Ｑ９２４Ｓ１、Ｑ５９１８８、Ｑ４２６７０、Ｐ２６６４７、Ｐ４４８４８、Ｑ９ＺＪＮ８、Ｏ２５９０３　Ｑ４２８６８、Ｑ４２８７０、Ｐ２６９７４、Ｐ３３３３３、Ｑ９ＸＦＷ４、ＣＱ８９１２５２、ＣＱ８９１２５０、ＣＱ８９１２６０、ＣＱ８９１２５８、ＣＱ８９１２４８、ＣＱ８９１２４５、ＣＱ８９１２４１、ＣＱ８９１２３８、ＣＱ８９１２５４、ＣＱ８９１２３５（ＬＰＡＡＴ）；ＡＹ４４５６３５、ＢＣ００３７１７、ＮＭ＿０１００４６、ＮＭ＿０５３４３７、ＮＭ＿１７４６９３、ＡＹ１１６５８６、ＡＹ３２７３２７、ＡＹ３２７３２６、ＡＦ２９８８１５、およびＡＦ１６４４３４（ＤＧＡＴ１）；およびＮＣ＿００１１４７［遺伝子座ＮＰ＿０１４８８８］、ＮＭ＿０１２０７９、ＮＭ＿１２７５０３、ＡＦ０５１８４９、ＡＪ２３８００８、ＮＭ＿０２６３８４、ＮＭ＿０１００４６、ＡＢ０５７８１６、ＡＹ０９３６５７、ＡＢ０６２７６２、ＡＦ２２１１３２、ＡＦ３９１０８９、ＡＦ３９１０９０、ＡＦ１２９００３、ＡＦ２５１７９４、およびＡＦ１６４４３４（ＤＧＡＴ２）；Ｐ４０３４５、Ｏ９４６８０、ＮＰ＿５９６３３０、ＮＰ＿１９００６９、およびＡＢ００６７０４［ｇｉ：２３５１０６９］（ＰＤＡＴ）。同様に特許文献は、ＴＡＧ生成に関与する多数の追加的な遺伝子のＤＮＡ配列（および／または上のいくつかの遺伝子に関する詳細およびそれらの単離方法）を提供する［例えば米国特許第５，２１０，１８９号明細書、国際公開第２００３／０２５１６５号パンフレット（ＧＰＡＴ）；ＥＰ第１１４４６４９Ａ２号明細書、ＥＰ第１１３１４３８号明細書、米国特許第５，９６８，７９１号明細書、米国特許第６，０９３，５６８号明細書、国際公開第２０００／０４９１５６号パンフレット、および国際公開第２００４／０８７９０２号パンフレット（ＬＰＡＡＴ）；米国特許第６，１００，０７７号明細書、米国特許第６，５５２，２５０号明細書、米国特許第６，３４４，５４８号明細書、米国特許出願公開第２００４／００８８７５９Ａ１号明細書および米国特許出願公開第２００４００７８８３６Ａ１号明細書（ＤＧＡＴ１）；米国特許出願公開第２００３／１２４１２６号明細書、国際公開第２００１／０３４８１４号パンフレット、米国特許出願公開第２００３／１１５６３２号明細書、米国特許出願公開第２００３／００２８９２３号明細書、および米国特許出願公開第２００

４／０１０７４５９号明細書（ＤＧＡＴ２）；国際公開第２０００／０６００９５号パンフレット（ＰＤＡＴ）；および国際公開第２００４／０７６６１７Ａ２号パンフレット（ＬＰＣＡＴ）。

【０２５７】

上の例は制限を意図するものではなく、ＤＧＡＴ１、ＤＧＡＴ２、ＰＤＡＴ、ＧＰＡＴ、ＬＰＣＡＴ、およびＬＰＡＡＴをコードする異なる供給源に由来する多数のその他の遺伝子が、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）への導入のために適切であろう。例えば本出願人らは、モルティエラ・アルピナ（Ｍｏｒｔｉｅｒｅｌｌａ　ａｌｐｉｎａ）（配列番号１２４および１２５）、ニューロスポラ・クラッサ（Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ　ｃｒａｓｓａ）（配列番号１２６）、ジベレラ・ゼアエ（Ｇｉｂｂｅｒｅｌｌａ　ｚｅａｅ）ＰＨ－１（配列番号１２７）、マグナポルテ・グリセア（Ｍａｇｎａｐｏｒｔｈｅ　ｇｒｉｓｅａ）（配列番号１２８）、およびアスペルギルス・ニデュランス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｄｕｌａｎｓ）（配列番号１２９）から新規ＤＧＡＴ１を同定し、モルティエラ・アルピナ（Ｍｏｒｔｉｅｒｅｌｌａ　ａｌｐｉｎａ）から新規ＤＧＡＴ２（配列番号１３６および１３７）、ＧＰＡＴ（配列番号１３８および１３９）、ＬＰＡＡＴ１（配列番号１０８および１０９）、およびＬＰＡＡＴ２（配列番号１１０および１１１）を同定した。

【０２５８】

ＤＨＡ合成に好ましいアシルトランスフェラーゼ遺伝子

しかしヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中での発現に適したアシルトランスフェラーゼの幅広い選択にもかかわらず、本発明の好ましい実施形態では、ＤＧＡＴ１、ＤＧＡＴ２、ＰＤＡＴ、ＧＰＡＴ、ＬＰＡＡＴ、およびＬＰＣＡＴは、顕著な量のより鎖長の長いω－６（例えばＡＲＡ）および／またはω－３（例えばＥＰＡ、ＤＨＡ）ＰＵＦＡを生成する生物から選択される。したがって以下の酵素（またはその誘導体）が特に好ましい。

【０２５９】

【表１８】

表8

ヤロウィア・リポリティカの高DHA生成株中における

発現のために好ましい異種のアシルトランスフェラーゼ

ORF	生物	参考文献	配列番号
DGAT1	*モルティエラ・アルピナ*	同時係属米国特許出願第11/024544号明細書	124,125
DGAT2	*モルティエラ・アルピナ*	同時係属米国特許出願第11/024545号明細書	136,137
GPAT	*モルティエラ・アルピナ*	-	138,139
LPAAT1	*モルティエラ・アルピナ*	-	108,109
LPAAT2	*モルティエラ・アルピナ*	同時係属米国仮特許出願第60/689031号明細書	110,111
LPCAT	*シノラブディス・エレガンス*	クローンT06E8.1、国際公開第2004/076617 A2号パンフレット	121

【０２６０】

ここでの本発明を制限することは意図しないが、野生型生物が全脂肪酸（ＴＦＡ）の５

０％を超える濃度でＡＲＡを合成できることから、Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）が異種アシルトランスフェラーゼの好ましい供給源として選択された。同様にしてＣ．エレガンス（ｅｌｅｇａｎｓ）は、そのＴＦＡの２０～３０％までをＥＰＡとして生成できる。

【０２６１】

もちろん本発明の代案の実施形態では、配列番号１０８～１１１、１２１、１２４、１２５、および１３６～１３９によってコードされるアシルトランスフェラーゼと実質的に同一のその他のＤＮＡもまた、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中での異種発現のために使用して、ＴＡＧ画分中のＤＨＡの生成および蓄積を容易にできる。より好ましい実施形態では、配列番号１０８～１１１、１２１、１２４、１２５、および１３６～１３９で述べられるものと実質的に同一のアシルトランスフェラーゼをコードするコドン最適化遺伝子が利用された。

【０２６２】

外来性遺伝子発現のための一般発現システム、カセット、ベクター、および形質転換

ＤＨＡの高レベル生成をもたらすものなどの外来性タンパク質の高レベル発現を指示する制御配列を含有する微生物発現システムおよび発現ベクターについては、当業者によく知られている。これらのいずれかを使用して、好ましいデサチュラーゼ、エロンガーゼ、およびアシルトランスフェラーゼをコードするキメラ遺伝子を構築できる。次にこれらのキメラ遺伝子をヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中に導入し、標準の形質転換法を使用して、コードした酵素の高レベル発現を提供できる。

【０２６３】

宿主細胞の形質転換に有用なベクターまたはＤＮＡカセットは、技術分野でよく知られている。コンストラクト中に存在する配列の具体的選択は、所望の発現産物、宿主細胞の性質、および提案される形質転換細胞と非形質転換細胞とを分離する手段に左右される。しかし典型的にベクターまたはカセットは、関連遺伝子の転写および翻訳を導く配列、選択マーカー、および自律複製または染色体組み込みを可能にする配列を含有する。適切なベクターは、転写開始を制御する遺伝子の５’領域（例えばプロモーター）、および転写終結を制御するＤＮＡ断片の３’領域（すなわちターミネーター）を含んでなる。双方の制御領域が、形質転換された宿主細胞の遺伝子に由来することが最も好ましいが、このような制御領域は、必ずしも生産宿主として選択された特定種に天然の遺伝子に由来しなくてよいものと理解される。

【０２６４】

別々の複製ベクターから２つ以上の遺伝子が発現する場合、各ベクターが異なる選択手段を有することが望ましく、他のコンストラクトに対する相同性を欠いて、安定した発現を維持し、コンストラクト中の要素の再集合を防止すべきである。調節領域、選択手段、および導入コンストラクト増殖方法の思慮深い選択は、全ての導入された遺伝子が必要なレベルで発現して、所望の生成物の合成を提供するように実験的に判定できる。

【０２６５】

関心のある遺伝子を含んでなるコンストラクトは、あらゆる標準的技術によって宿主細胞に導入してもよい。これらの技術としては、形質転換（例えば酢酸リチウム形質転換［Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ、１９４：１８６～１８７頁（１９９１年）］）、プロトプラスト融合、微粒子銃衝撃、電気穿孔、マイクロインジェクション、または宿主細胞中に関心のある遺伝子を導入するその他のあらゆる方法が挙げられる。ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）に適用できるより具体的な教示としては、米国特許第４，８８０，７４１号明細書、米国特許第５，０７１，７６４号明細書、およびチエン（Ｃｈｅｎ），Ｄ．Ｃ．ら著、「Ａｐｐｌ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．」４８（２）：２３２～２３５頁（１９９７年）が挙げられる。

【０２６６】

便宜上、ＤＮＡ配列（例えば発現カセット）を取り込むように、あらゆる方法によって

操作されている宿主細胞を「形質転換された」または「組換え」とここで称する。形質転換された宿主は、遺伝子がゲノム中に組み込まれるか、増幅されるか、または複数のコピー数を有する染色体外要素上に存在するかどうか次第で、発現コンストラクトの少なくとも１つのコピーを有し、２つ以上を有してもよい。形質転換宿主細胞は、国際公開第２００４／１０１７５７号パンフレットおよび国際公開第２００５／００３３１０号パンフレットで述べられるようにして、様々な選択技術によって同定できる。

【０２６７】

ここで使用するための好ましい選択方法は、カナマイシン、ハイグロマイシン、およびアミノグリコシドＧ４１８に対する抵抗性、ならびにウラシル、ロイシン、またはヒスチジンを欠く培地に生育する能力である。代案の実施形態では、５－フルオロオロト酸（５－フルオロウラシル－６－カルボン酸一水和物、「５－ＦＯＡ」）が、酵母Ｕｒａ⁻突然変異体の選択のために使用される。化合物はオロチジン５’－一リン酸デカルボキシラーゼ（ＯＭＰデカルボキシラーゼ）をコードする機能性ＵＲＡ３遺伝子を有する酵母細胞に対して有毒である。したがってこの毒性に基づいて、５－ＦＯＡはＵｒａ⁻突然変異酵母株の選択および同定のために特に有用である（バーテル（Ｂａｒｔｅｌ），Ｐ．Ｌ．およびフィールズ（Ｆｉｅｌｄｓ），Ｓ．著、「酵母２－ハイブリッド・システム（Ｙｅａｓｔ　２－Ｈｙｂｒｉｄ　Ｓｙｓｔｅｍ）」、Ｏｘｆｏｒｄ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ：Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ、第７巻、１０９～１４７頁、１９９７年）。

【０２６８】

ここで利用された代案の好ましい選択方法は、スルホニル尿素抵抗性に基づく、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）のための顕性の非抗生物質マーカーに依存する。技術はまた、半数体、二倍体、異数体または異種接合体であってもよい、その他の工業酵母株にも一般に適用できる。工業酵母株のための遺伝的形質転換システムの開発に対する次の２つの主要な制限を克服することが期待される。（１）天然の栄養要求株がほとんどなく、自然発生または誘導栄養要求性突然変異体の単離は株の倍数性によって妨げられる。（２）抗生物質抵抗性マーカーの使用は、抗生物質抵抗性遺伝子を持つ遺伝子改変生物の放出に対する制限のために、株の商業利用を制限するかもしれない。ピュイグ（Ｐｕｉｇ）らは、Ｊ．Ａｇｒｉｃ．Ｆｏｏｄ　Ｃｈｅｍ．４６：１６８９～１６９３頁（１９９８年）で、標的株をウリジン栄養要求株にするための遺伝子操作、および関心のある特質を導入するためのＵＲＡ３マーカーの引き続く使用に基づいて、これらの制限を克服する方法を開発したが、このストラテジーは日常的業務のためには面倒過ぎると見なされた。

【０２６９】

ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）を形質転換するためのここで開示される新しいスルホニル尿素抵抗性選択マーカーは、外来性遺伝子に依存しないが、突然変異天然遺伝子に依存する。したがってそれは栄養要求性を必要とせず、また栄養要求株ももたらさず野性型株の形質転換を可能にする。より具体的にはマーカー遺伝子（配列番号２４３）は、スルホニル尿素除草剤抵抗性を与える単一アミノ酸変化（Ｗ４９７Ｌ）を有する天然アセトヒドロキシ酸シンターゼ（ＡＨＡＳまたはアセト乳酸シンターゼ；Ｅ．Ｃ．４．１．３．１８）である。ＡＨＡＳは分枝鎖アミノ酸生合成経路中の最初の一般的な酵素であり、それはスルホニル尿素およびイミダゾリノン除草剤の標的である。Ｗ４９７Ｌ突然変異は、サッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）の研究に基づき知られている（ファルコ（Ｆａｌｃｏ），Ｓ．Ｃ．、ら著、「Ｄｅｖ．Ｉｎｄ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．」３０：１８７～１９４頁（１９８９年）；ダグルビー（Ｄｕｇｇｌｅｂｙ），Ｒ．Ｇ．、ら、「Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．」２７０：２８９５頁（２００３年））。最初の試験は、以下の結果として、ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）細胞が除草剤に自然に抵抗性でないことを判定した。１．）除草剤の取り込み不良または皆無、２．）ＡＨＡＳの形態の天然除草剤抵抗性の存在、および／または３．）除草剤不活性化機序の使用。これによって形質転換体選択手段としての突然変異ＡＨＡＳ遺伝子（配列番号２４３）の合成および使用が可能になっ

た。

【０２７０】

選択マーカーをリサイクルする追加的方法は、部位特異的リコンビナーゼシステムに依存する。簡単に述べると、部位特異的遺伝子組換えシステムは、以下の２つの要素からなる。（１）特徴的なＤＮＡ配列［例えばＬｏｘＰ］を有する遺伝子組換え部位、および（２）２つの以上の遺伝子組換え部位が、同一ＤＮＡ分子上に特定間隔で同一方向に配向する場合、特異的にＤＮＡ配列に結合して、ＤＮＡ配列間の遺伝子組換え（すなわち切除）を触媒するリコンビナーゼ酵素［例えばＣｒｅ］。複数の逐次形質転換中での使用のために好ましい一組の選択マーカーを「リサイクル」することが可能なので、この方法には選択手段としての用途がある。

【０２７１】

具体的には、宿主ゲノム中への挿入が望ましい標的遺伝子（例えばデサチュラーゼ、エロンガーゼ、アシルトランスフェラーゼ）、ならびに遺伝子組換え部位の側面に位置する第１の選択マーカー（例えばＵｒａ３、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ［ＨＰＴ］）を含んでなる組み込みコンストラクトを作り出す。形質転換および形質転換体の選択に続いて、第２の選択マーカー（例えばスルホニル尿素抵抗性［ＡＨＡＳ］）を保有する複製型プラスミド、およびゲノム中に導入された部位特異的遺伝子組換え部位を認識するのに適したリコンビナーゼの導入によって、第１の選択マーカーが染色体から切除される。第２のマーカーを保有する形質転換体の選択および宿主ゲノムからの第１の選択マーカーの切除の確認に続いて、次に複製型プラスミドを選択不在下で宿主からキュアリングした。これによって第１のまたは第２の選択マーカーのどちらも有さない形質転換体が生成し、したがって形質転換の別の一巡のためのキュアリング株が入手できる。当業者は、方法が本発明で使用される特定の選択マーカーまたは部位特異的遺伝子組換えシステムに限定されないことを認識する。

【０２７２】

ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）における外来性遺伝子の過剰発現

当業者にはよく知られているように、遺伝子（例えばデサチュラーゼ）をクローニングベクターに単に挿入するだけでは、それが必要なレベルで成功裏に発現することは保証されない。転写、翻訳、タンパク質安定性、酸素制限、および宿主細胞からの分泌の側面を制御するいくつかの遺伝子要素を操作することが望ましいかもしれない。より具体的には以下を変化させることで、遺伝子発現を制御してもよい。関連転写プロモーターおよびターミネーター配列の性質、クローンされた遺伝子のコピー数、および遺伝子がプラスミド上にあるかまたは宿主細胞のゲノム中に組み込まれているかどうか、合成された外来タンパク質の最終細胞内位置、宿主生物中の翻訳効率、宿主細胞内のクローン遺伝子タンパク質の本質的な安定性、および頻度が宿主細胞の好むコドン使用頻度に近づくようなクローン遺伝子内のコドン使用。これらのいくつかの過剰発現方法について下で考察し、それらはヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）において、例えばデサチュラーゼ、エロンガーゼ、およびアシルトランスフェラーゼを過剰発現する手段として、本発明中で有用である。

【０２７３】

所望の遺伝子の発現は、ｍＲＮＡまたはコードされたタンパク質のどちらかから不安定配列を除去／消去して、またはｍＲＮＡに安定化配列を付加して（米国特許第４，９１０，１４１号明細書）、より強力なプロモーター（調節または構成のどちらか）の使用を通じて発現増大を引き起こし、転写レベルで増大できる。

【０２７４】

所望の宿主細胞中で、デサチュラーゼ、エロンガーゼ、およびアシルトランスフェラーゼ遺伝子の発現を推進するのに有用な開始制御領域またはプロモーターは多数あり、当業者にはなじみが深い。ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中でこれらの遺伝子の発現を導くことができる、実質的にあらゆるプロモーターが

本発明に適する。宿主細胞中での発現は、一時的または安定様式で達成できる。一時的発現は、関心のある遺伝子に作動可能に連結された、調節可能プロモーターの活性を誘導することで達成でき、代案としては安定発現が、関心のある遺伝子に作動可能に連結された構成的プロモーターの使用によって達成できる。一例として宿主細胞が酵母菌の場合、酵母菌細胞中で機能する転写および翻訳領域は、特に宿主種から提供される。転写開始調節領域は、例えば次から得ることができる。１．）アルコールデヒドロゲナーゼ、グリセルアルデヒド３－リン酸－デヒドロゲナーゼ、ホスホグリセリン酸ムターゼ、フルクトース－ビスリン酸アルドラーゼ、ホスホグルコース－イソメラーゼ、ホスホグリセラートキナーゼ、グリセロール－３－リン酸－Ｏ－アシルトランスフェラーゼなどの解糖経路中の遺伝子、または２．）酸ホスファターゼ、ラクターゼ、メタロチオネイン、グルコアミラーゼ、翻訳延長因子ＥＦ１－α（ＴＥＦ）タンパク質（米国特許第６，２６５，１８５号明細書）、リボソームタンパク質Ｓ７（米国特許第６，２６５，１８５号明細書）、アンモニウム輸送体タンパク質、輸出タンパク質などの調節可能遺伝子。構成的または誘導的転写が所望されるかどうか、関心のあるＯＲＦを発現する上でのプロモーター効率、構築の容易さなど次第で、いくつかの制御配列のいずれか１つを使用できる。上に提供した例は、ここでの本発明における制限を意図しない。

【０２７５】

当業者は承知しているように、様々なプロモーターの活性を比較する多様な方法が利用できる。このタイプの比較は、ω－６およびω－３脂肪酸生成に有用なキメラ遺伝子を構築するのに一揃いのプロモーターが必要である、将来の応用で使用するための各プロモーターの強度決定を容易にするのに有用である。したがってレポーター遺伝子（すなわちβ－グルクロニダーゼ（ＧＵＳ）をコードする大腸菌（Ｅ．Ｃｏｌｉ）遺伝子）の発現に基づいて、プロモーター活性を間接に定量化することが有用かもしれない。代案の実施形態では、より定量的な手段を使用してプロモーター活性を定量化することが有用な場合もある。適切な一方法は、リアルタイムＰＣＲの使用である（リアルタイムＰＣＲ応用の一般レビューについては、ギンジンガー（Ｇｉｎｚｉｎｇｅｒ），Ｄ．Ｊ．著、Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ　Ｈｅｍａｔｏｌｏｇｙ、３０：５０３～５１２頁（２００２年）を参照されたい）。リアルタイムＰＣＲは、蛍光性レポーターの検出および定量化に基づく。このシグナルは、反応中のＰＣＲ生成物量と正比例して増大する。各サイクルにおいて蛍光放出量を記録することで、対数期中にＰＣＲ反応をモニターすることが可能であり、そこではＰＣＲ生成物量の最初の顕著な増大が標的テンプレートの初期量に相関する。単位複製配列の定量的な検出のために、（１）蛍光性プローブの使用、または（２）ＤＮＡ結合作用物質（例えばＳＹＢＲ－ｇｒｅｅｎ　Ｉ、臭化エチジウム）の使用の２つの一般方法がある。相対遺伝子発現比較のために内部標準として内在性対照（例えば染色体性にコードされる１６Ｓ　ｒＲＮＡ遺伝子）を使用することが必要であり、それによって各リアルタイムＰＣＲ反応に添加された全ＤＮＡ量の差について正規化できるようになる。リアルタイムＰＣＲの具体的方法については、技術分野でたくさん書かれている。例えば「リアルタイムＰＣＲ特別号（Ｒｅａｌ　Ｔｉｍｅ　ＰＣＲ　Ｓｐｅｃｉａｌ　Ｉｓｓｕｅ）」、Ｍｅｔｈｏｄｓ、２５（４）：３８３～４８１頁（２００１年）を参照されたい。

【０２７６】

リアルタイムＰＣＲ反応に続いて、以下の使用によって、記録された蛍光強度を使用してテンプレートの量を定量化する。１．）絶対標準法（生体外（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）翻訳ＲＮＡ（ｃＲＮＡ）などの既知量の標準が使用される）、２．）相対標準法（各ランにおいて既知量の標的核酸がアッセイデザインに含まれる）、または３．）遺伝子発現の相対定量化のための比較C_T法（$\Delta\Delta C_T$）（標的配列の相対量が選択された基準値のいずれかと比べられ、基準値と比較して結果が得られる）。比較C_T法は、最初に標的のC_T値と正規化群の間の差（ΔC_T）を判定することを要し、$\Delta C_T = C_T$（標的）$- C_T$（正規化群）である。この値を定量化する各サンプルについて計算し、それに対して各比較がなされる基準として、１個のサンプルを選択しなくてはならない。比較$\Delta\Delta C_T$計算は、各サンプルΔC_TとベースラインΔC_Tの間の差を見いだし、次にこれらの値を式$2^{-\Delta}$

ΔＣＴに従って絶対値に変換することを伴う。

【０２７７】

しかしヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中での発現に適することができるプロモーターの幅広い選択にもかかわらず、本発明の好ましい実施形態では、プロモーターは下の表９に示すもの（またはその誘導体）から選択される。

【０２７８】

【表１９】

表9

*ヤロウィア・リポリティカ*における

過剰発現に好ましい天然プロモーター

プロモーター名称	位置*	天然遺伝子	活性「格付け」	参考文献	配列番号
TEF	-	翻訳延長因子EF1-α	1	ミュラー(Muller)らに付与された米国特許第6,265,185号明細書、ジェンバンク登録番号AF054508	218
GPD	-968bp～+3bp	グリセルアルデヒド-3-リン酸-デヒドロゲナーゼ	2	国際公開第2005/003310号パンフレット	210
GPM	-875bp～+3bp	ホスホグリセリン酸ムターゼ	1	国際公開第2005/003310号パンフレット	212
FBA	-1001bp～-1bp	フルクトース-ビスリン酸アルドラーゼ	4	国際公開第2005/049805号パンフレット	213
FBAIN	-804bp～+169bp（102bpのイントロン[+64～+165]を含む）	フルクトース-ビスリン酸アルドラーゼ	7	国際公開第2005/049805号パンフレット	214
FBAINm	-804bp～+169bp修正あり***	フルクトース-ビスリン酸アルドラーゼ	5	国際公開第2005/049805号パンフレット	215
GPDIN	-973bp～+201bp（146bpのイントロン[+49～+194]を含む）	グリセルアルデヒド-3-リン酸-デヒドロゲナーゼ	3	同時係属米国特許出願第11/183664号明細書	211
GPAT	-1130～+3bp	グリセロール-3-リン酸O-アシルトランスフェラーゼ	5	同時係属米国特許出願第11/225354号明細書	216
YAT1	-778～-1bp	アンモニウム輸送体酵素	6	同時係属米国特許出願第11/185301号明細書	217
EXP1	-1000～-1bp	輸出タンパク質	6	-	221

* 位置は天然遺伝子に対するものであり、「ATG」翻訳開始コドンの「A」の位置は+1と命名される。

*** FBAINmプロモーターはFBAINプロモーターの修正バージョンであり、FBAINmはFBAINプロモーターのATG翻訳開始コドンとイントロンの間の52bpの欠失（それによってN-末端の22個のアミノ酸のみを含む）、およびイントロンの後ろの新しい翻訳共通モチーフを有する。さらにFBAINプロモーターと発現させる遺伝子コード領域とを融合させると融合タンパク質が発生するのに対し、FBAINmプロモーターはこのような融合タンパク質を発生させない。

【０２７９】
ＧＰＭの活性がＴＥＦとほぼ同じであるのに対し、ＧＰＤ、ＦＢＡ、ＦＢＡＩＮ、ＦＢＡＩＮｍ、ＧＰＤＩＮ、ＧＰＡＴ、ＹＡＴ１、およびＥＸＰ１の活性は、全てＴＥＦを超える（活性は「活性順位」と題された欄で相対様式で定量化され、「１」は最低活性のプロモーターに対応するのに対し、「７」は最高活性のプロモーターに対応する）。この定量化は、レポーターとしてのβ－グルクロニダーゼ（ＧＵＳ）をコードする大腸菌（Ｅ．Ｃｏｌｉ）遺伝子（ジェファーソン（Ｊｅｆｆｅｒｓｏｎ），Ｒ．Ａ．著、Ｎａｔｕｒｅ．１４；３４２：８３７～８３８頁（１９８９年））、およびヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）Ｘｐｒ遺伝子の約１００ｂｐの３’領域を有するキメラ遺伝子を作り出すために各プロモーターが使用される、比較研究に基づく。各発現コンストラクト中のＧＵＳ活性は、組織化学的および／または蛍光定量的アッセイ（ジェファーソン（Ｊｅｆｆｅｒｓｏｎ），Ｒ．Ａ．著、「Ｐｌａｎｔ　Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．Ｒｅｐｏｒｔｅｒ」５：３８７～４０５頁（１９８７年））によって、および／またはリアルタイムＰＣＲの使用によって測定された。

【０２８０】
ＹＡＴ１プロモーターは、本出願人らによって、ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）内で同定された、油性条件（すなわち窒素制限）下で誘導可能な第１のプロモーターとして特徴づけられた、という点においてユニークである。具体的には、ＹＡＴ１プロモーターは窒素含有（例えば約０．５％までの硫酸アンモニウム）培地中で活性であるが、宿主細胞を窒素制限条件（例えば非常に低レベルのアンモニウムを含有する、またはアンモニウムを欠く培地中）下で生育させると、プロモーター活性が増大する。したがって好ましい培地は、約０．１％未満の硫酸アンモニウムまたはその他の適切なアンモニウム塩を含有するものである。より好ましい実施形態では、約８～１２％のグルコースおよび約０．１％以下の硫酸アンモニウムを含有する高グルコース培地（ＨＧＭ）などの高い炭素対窒素（すなわちＣ：Ｎ）比の培地中で宿主細胞を生育させると、ＹＡＴ１プロモーターが誘導される。これらの条件はまた、油性酵母（例えばヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ））中で油脂生成を誘導するのにも十分である。細胞抽出物のＧＵＳ活性に基づいて、ＹＡＴ１プロモーター活性は、細胞を最小培地からＨＧＭに移して２４時間生育させると約３７倍増大し、ＨＧＭ中で１２０時間後には活性はいくらか低下するが、なおも窒素を含んでなる最小培地中での活性よりも２５倍高い（実施例１）。

【０２８１】
もちろん本発明の代案の実施形態では、表９で上述したプロモーター領域のいずれかに由来するその他のプロモーターもまた、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中での異種発現のために使用して、ＴＡＧ画分中のＤＨＡの生成および蓄積を容易できる。特に上述のプロモーターのいずれかの長さの修正は、これらの制御配列の正確な境界が完全に画定されていないので、同一活性を有する突然変異プロモーターをもたらすことができる。代案の実施形態では、ＦＢＡＩＮおよびＧＰＤＩＮプロモーターのイントロン内に位置するエンハンサーを使用して、天然ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）プロモーターと比べて活性増大を有するキメラプロモーターを作り出すことができる（例えばキメラＧＰＭ：：ＦＢＡＩＮおよびＧＰＭ：：ＧＰＤＩＮプロモーター（配列番号２１９および２２０）は、ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）Ｘｐｒ遺伝子の約１００ｂｐの３’領域によってＧＵＳレポーター遺伝子発現を推進すると、ＧＰＭプロモーター単独と比べて活性が増大した）。

【０２８２】
終結領域は、それから開始領域が得られた遺伝子の３’領域から、または異なる遺伝子から誘導されることができる。多数の終結領域が知られており、（それらが由来するのと同一および異なる属および種の双方で使用した際に）多様な宿主において満足に機能する。終結領域は、通常特定の特性のためと言うよりも便宜的に選択される。好ましくは終結領域は、特にサッカロミセス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）、分裂酵母（Ｓｃｈｉｚｏ

ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）、カンジダ（Ｃａｎｄｉｄａ）、ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）またはクリヴェロミセス（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ）である酵母菌遺伝子から誘導される。γ－インターフェロンおよびα－２インターフェロンをコードする哺乳類の遺伝子の３’領域もまた、酵母菌中で機能することが知られている。終結制御領域もまた、好ましい宿主に天然の様々な遺伝子から誘導されてもよい。場合により終結部位は不必要かもしれないが、含まれることが最も好ましい。制限は意図しないが、ここでの開示で有用な終結領域としては以下が挙げられる。ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）細胞外プロテアーゼ（ＸＰＲ、ジェンバンク登録番号Ｍ１７７４１）の約１００ｂｐの３’領域；アシル－ｃｏＡオキシダーゼ（Ａｃｏ３、ジェンバンク登録番号ＡＪ００１３０１およびＮｏ．ＣＡＡ０４６６１；Ｐｏｘ３：ジェンバンク登録番号ＸＰ＿５０３２４４）ターミネーター；Ｐｅｘ２０（ジェンバンク登録番号ＡＦ０５４６１３）ターミネーター；Ｐｅｘ１６（ジェンバンク登録番号Ｕ７５４３３）ターミネーター；Ｌｉｐ１（ジェンバンク登録番号Ｚ５００２０）ターミネーター；Ｌｉｐ２（ジェンバンク登録番号ＡＪ０１２６３２）ターミネーター；および３－オキソアシル－ｃｏＡチオラーゼ（ＯＣＴ、ジェンバンク登録番号Ｘ６９９８８）ターミネーター。

【０２８３】

上述のデサチュラーゼ、エロンガーゼおよび／またはアシルトランスフェラーゼ遺伝子の追加的コピー（すなわち２コピー以上）をヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）に導入し、それによってＤＨＡの生産および蓄積増大してもよい。具体的には、遺伝子の追加的コピーを単一発現コンストラクト内でクローンしてもよく、および／またはプラスミドコピー数を増大させてまたはクローンされた遺伝子のゲノムへの複数組み込みによって（下記）、クローンされた遺伝子の追加的コピーを宿主細胞内に導入してもよい。例えば一実施形態では、ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）ゲノムに、次を含んでなるキメラ遺伝子を導入して組み込むことで、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）株（すなわちＹ３０００株）を操作して、５％を超えるＤＨＡを生成した。３コピーのΔ１２デサチュラーゼ、２コピーのΔ６デサチュラーゼ、４コピーの$C_{18/20}$エロンガーゼ、５コピーのΔ５デサチュラーゼ、３コピーのΔ１７デサチュラーゼ、３コピーの$C_{16/18}$エロンガーゼ、１コピーの$C_{20/22}$エロンガーゼ、および１コピーのΔ４デサチュラーゼ。

【０２８４】

一般に、油性酵母中での発現に適したＤＮＡ（例えばプロモーター、ＯＲＦ、およびターミネーターを含んでなるキメラ遺伝子）がひとたび得られると、それを宿主細胞中で自律複製できるプラスミドベクターに入れ、または宿主細胞ゲノム中に直接組み込む。発現カセットの組み込みは、宿主ゲノム内で無作為に起きることができ、または宿主遺伝子座との遺伝子組換えを標的とするのに十分な宿主ゲノムとの相同性領域を含有するコンストラクトの使用を通じて、標的を定めることができる。本発明では依存しないが、内在性遺伝子座によって転写および翻訳調節領域の全てまたはいくつかを提供でき、コンストラクトは内在性遺伝子座を標的とする。

【０２８５】

本発明では、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中で遺伝子を発現する好ましい方法は、宿主ゲノム中への直鎖ＤＮＡ組み込みによるものである。そしてゲノム内の複数位置への組み込みは、遺伝子の高レベル発現が所望される場合に特に有用であることができる。このような目的で、複数コピー中に存在するゲノム内の配列を同定することが望ましい。

【０２８６】

シュミット－ベルガー（Ｓｃｈｍｉｄ－Ｂｅｒｇｅｒ）らは、「Ｊ．Ｂａｃｔ．」１７６（９）：２４７７～２４８２頁（１９９４年）で、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中に第１のレトロトランスポゾン様要素Ｙｌｔ１を発見した。このレトロトランスポゾンは、ゼータ領域と称される長い末端反復（ＬＴＲ、それぞれ長さおよそ７００ｂｐ）の存在によって特徴づけられる。Ｙｌｔ１および単独ゼ

ータ要素は、それぞれ少なくとも３５コピー／ゲノムおよび５０～６０コピー／ゲノムで、ゲノム内に分散様式で存在し、どちらの要素も相同的組換え部位として機能すると判定された。さらにユーレットツェック（Ｊｕｒｅｔｚｅｋ）らは、「Ｙｅａｓｔ」、１８：９７～１１３頁（２００１年）の研究で、（両端にＬＴＲゼータ領域がある直鎖ＤＮＡを使用して）酵母ゲノムの反復領域をプラスミドの標的にすることで、低コピープラスミド形質転換体を使用して得られた発現と比べて、遺伝子発現が劇的に増大できることを実証した。したがってゼータ誘導組み込みは、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）へのプラスミドＤＮＡの複数組み込みを確実にする手段として理想的であることができ、それによって高レベル遺伝子発現を可能にする。しかし残念なことに、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）の全株がゼータ領域を有するわけではない（例えばＡＴＣＣ＃２０３６２として同定された株）。株がこのような領域を欠く場合、発現カセットを含んでなるプラスミドＤＮＡを代案の遺伝子座に組み込んで、発現カセットの所望コピー数に達するようにすることもまた可能である。例えば好ましい代案の遺伝子座としては、Ｕｒａ３遺伝子座（ジェンバンク登録番号ＡＪ３０６４２１）、Ｌｅｕ２遺伝子遺伝子座（ジェンバンク登録番号ＡＦ２６０２３０）、Ｌｙｓ５遺伝子（ジェンバンク登録番号Ｍ３４９２９）、Ａｃｏ２遺伝子遺伝子座（ジェンバンク登録番号ＡＪ００１３００）、Ｐｏｘ３遺伝子遺伝子座（Ｐｏｘ３：ジェンバンク登録番号ＸＰ＿５０３２４４；またはＡｃｏ３：ジェンバンク登録番号ＡＪ００１３０１）、Δ１２デサチュラーゼ遺伝子遺伝子座（配列番号２８）、Ｌｉｐ１遺伝子遺伝子座（ジェンバンク登録番号Ｚ５００２０）および／またはＬｉｐ２遺伝子遺伝子座（ジェンバンク登録番号ＡＪ０１２６３２）が挙げられる。

【０２８７】

有利なことにＵｒａ３遺伝子は、５－ＦＯＡ選択（前出）と組み合わせて繰り返し使用できる。より具体的には最初に天然Ｕｒａ３遺伝子をノックアウトして、Ｕｒａ－表現型を有する株を生成でき、そこで選択は５－ＦＯＡ抵抗性に基づいて生じる。次に複数のキメラ遺伝子クラスターおよび新しいＵｒａ３遺伝子をヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）ゲノムの異なる遺伝子座に組み込み、それによってＵｒａ＋表現型を有する新しい株を生成することができる。引き続く組み込みは、導入されたＵｒａ３遺伝子がノックアウトされると、新しいＵｒａ３－株（これも５－ＦＯＡ選択使用して同定された）を生成する。したがってＵｒａ３遺伝子（と組み合わさった５－ＦＯＡ選択）は形質転換の複数サイクル中で選択マーカーとして使用でき、それによって容易に、遺伝的修正がヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）ゲノムに容易な様式で組み込めるようにする。

【０２８８】

用途によっては、本タンパク質を異なる細胞区画に向けることが有用であろう（例えばアシル－ＣｏＡプール対ホスファチジルコリンプール）。ここで述べられる目的のためには、ＤＨＡが遊離脂肪酸として、またはアシルグリセロール、リン脂質、スルホリピドまたは糖脂質などのエステル化形態で見いだされてもよい。ＤＨＡ生合成を可能にするポリペプチドをコードする上述のキメラ遺伝子をさらに遺伝子操作して、適切な細胞内標的配列を含めてもよいことが構想された。

【０２８９】

ユーレットツェック（Ｊｕｒｅｔｚｅｋ）らは、「Ｙｅａｓｔ」、１８：９７～１１３頁（２００１年）で、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中に組み込んだプラスミドコピー数の安定性が、使用される個々の形質転換体、受容株、および標的プラットフォームに依存することに気づいた。したがって当業者は、所望の発現レベルおよびパターンを示す株を得るために複数の形質転換体をスクリーンしなくてはならないことを認識する。このようなスクリーニングは、ＤＮＡブロットのサザン分析（サザン（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ）著、「Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．」９８：５０３頁（１９７５年））、ｍＲＮＡ発現のノーザン分析（クロツェック（Ｋｒｏｃｚｅｋ）著、「Ｊ．Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ａｐｐｌ．」、６１８（１～２）：１３３～１４５頁（１９９３年））、タンパク質発現のウェスタン分析、ＰＵＦＡ生成物の表現型分

析またはＧＣ分析によって達成されてもよい。

【０２９０】

要約すると、上述の各手段が、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）における特定遺伝子産物（例えばデサチュラーゼ、エロンガーゼ、アシルトランスフェラーゼ）の発現を増大させるのに有用であり、バイオテクノロジーの当業者は、方法の最も適切な組み合わせを容易に選択してＤＨＡの高生産を可能にできる。

【０２９１】

ＤＨＡ生成増大のための経路エンジニアリング

上述の方法は個々の異種遺伝子の発現をアップレギュレートするのに有用であるが、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中でＤＨＡ生成を増大させるというチャレンジは、はるかにより複雑であり、様々な代謝経路の協調操作を必要とするかもしれない。ＰＵＦＡ生合成経路中の操作について最初に対処し、それにＴＡＧ生合成経路およびＴＡＧ分解経路中の望ましい操作が続く。

【０２９２】

既述したように、全油画分中に５％を超えるＤＨＡ、またはより好ましくは全油画分中に１０％を超えるＤＨＡ、またはさらにより好ましくは全油画分中に１５～２０％を超えるＤＨＡ、または最も好ましくは全油画分中に２５～３０％を超えるＤＨＡを生成するヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）株の構築は、（１）Δ６デサチュラーゼ／Δ６エロンガーゼ経路発現のための少なくとも次の遺伝子を必要とする。Δ６デサチュラーゼ、$C_{18/20}$エロンガーゼ、Δ５デサチュラーゼ、Δ１７デサチュラーゼまたはΔ１５デサチュラーゼのどちらか（または双方）、$C_{20/22}$エロンガーゼ、およびΔ４デサチュラーゼ、または（２）Δ９エロンガーゼ／Δ８デサチュラーゼ経路発現のための少なくとも次の遺伝子。Δ９エロンガーゼ、Δ８デサチュラーゼ、Δ５デサチュラーゼ、Δ１７デサチュラーゼまたはΔ１５デサチュラーゼのどちらか（または双方）、$C_{20/22}$エロンガーゼ、およびΔ４デサチュラーゼ。しかしどちらの実施形態でも、Δ９デサチュラーゼ、Δ１２デサチュラーゼ、$C_{14/16}$エロンガーゼおよび／または$C_{16/18}$エロンガーゼを宿主株中にさらに含めることが望ましいかもしれない。

【０２９３】

フザリウム・モニリフォルメ（Ｆｕｓａｒｉｕｍ　ｍｏｎｉｌｉｆｏｒｍｅ）Δ１２デサチュラーゼは％基質変換の増大を示すので（国際公開第２００５／０４７４８５号パンフレット）、場合によっては天然ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）Δ１２デサチュラーゼをそれで置換することが有利であると立証されるかもしれない。より具体的には、どちらのΔ１２デサチュラーゼもオレイン酸からＬＡへの変換を触媒するが、２つの酵素はそれらの全体的特異性が異なる（それによって各酵素の％基質変換に影響を与える）。本出願人らはＦ．モニリフォルメ（ｍｏｎｉｌｉｆｏｒｍｅ）Δ１２デサチュラーゼが、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）Δ１２デサチュラーゼよりも高いＬＡ負荷能力をホスファチジルコリン基質のｓｎ－２位に有すると判定した（それによってΔ６デサチュラーゼによる引き続く反応が容易になる）。これに基づいて、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）Δ１２デサチュラーゼのノックアウトと併せたＦ．モニリフォルメ（ｍｏｎｉｌｉｆｏｒｍｅ）Δ１２デサチュラーゼの過剰発現は、引き続くＤＨＡへの変換に生成物増大をもたらすかもしれない。

【０２９４】

いくつかの実施形態では、宿主生物の天然ＤＡＧ　ＡＴ活性を調節し、それによってＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）宿主の脂肪および油内のＰＵＦＡのパーセントの操作を可能にすることが有用かもしれない。具体的には油生合成は、油生成中にポリ不飽和化と競合することが予期されるので、生物体の１個もしくは以上のアシルトランスフェラーゼ（例えばＰＤＡＴおよび／またはＤＧＡＴ１および／またはＤＧＡＴ２）の活性を低下させまたは不活性化し、それによって脂肪および油画分に組み込まれる（全脂肪酸に対する）ＰＵＦＡのパーセントを同時に増大させながら、油生合成の全体的速度を低下

させることが可能である。これはポリ不飽和化がより効率的に起きるようになる、または換言すれば、特異的ＤＡＧ　ＡＴの活性をダウンレギュレートすることにより、油生合成とポリ不飽和化間の基質競合が減少して、油生成中のポリ不飽和化に有利になるためである。

【０２９５】

当業者は、ダウンレギュレーションの最適レベルを解明するのに必要な技能、およびこのような阻害を達成するのに必要な手段を有する。例えばいくつかの好ましい実施形態では、単一ＤＡＧ　ＡＴの活性を操作することが望ましいかもしれない（例えばＤＧＡＴ１ノックアウトを作り出す一方、ＰＤＡＴおよびＤＧＡＴ２の活性は改変されない）。代案の実施形態では、全部で「ｎ」個の天然ＤＡＧ　ＡＴおよび全部で「ｎ－１」個のアシルトランスフェラーゼ活性を含んでなる油性生物が変性され、低下した油生合成速度がもたらされる一方、残るアシルトランスフェラーゼはその野生型活性を保持する。そして、場合によっては、いくつかの好ましい油性生物中で天然ＤＡＧ　ＡＴ全部の活性を操作して、ポリ不飽和化速度に対する油生合成の最適速度を達成することが望ましいかもしれない。

【０２９６】

同様にして本出願人らは、対応する天然ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）アシルトランスフェラーゼのノックアウトと併せた異種のアシルトランスフェラーゼの発現が、宿主細胞中で生成される総ＤＨＡを顕著に増大できることを仮定する。具体的には先に提案されたように、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中で自然に生成されるＰＵＦＡは１８：２脂肪酸に限定され、天然酵素はより鎖長の長い脂肪酸との反応を効率的に触媒しないかもしれないので、Ｃ２０以上の脂肪酸に対する特異性を有する異種のＧＰＡＴ、ＬＰＡＡＴ、ＤＧＡＴ１、ＤＧＡＴ２、ＰＤＡＴ、およびＬＰＣＡＴアシルトランスフェラーゼが天然酵素よりも好ましい。この結論に基づいて、本出願人らはＭ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）中でＧＰＡＴ、ＬＰＡＡＴ、ＤＧＡＴ１、およびＤＧＡＴ２をコードする遺伝子を同定し、これらの遺伝子をＥＰＡを生成するように組換えヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）宿主中で発現して、ＰＵＦＡの生合成増大をもたらした（ここでの実施例１７～２０）。引き続いて天然および異種のアシルトランスフェラーゼ間の基質競合を低下させる手段として、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中のいくつかの天然アシルトランスフェラーゼ（例えばＤＧＡＴ１およびＤＧＡＴ２）の活性を減少させまたはノックアウトした。ＤＨＡを生成する組換えヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）宿主においても、同様の結果が期待された。

【０２９７】

ＤＨＡ生産に影響する経路および包括的制御因子の操作もまた、考慮しなくてはならない。例えばパルミチン酸（１６：０）およびステアリン酸（１８：０）などの鎖長がより長い飽和および不飽和脂肪酸前駆物質の可用性を増大させることによって、ＰＵＦＡ生合成経路への炭素流量を増大させることは有用である。前者の合成が$C_{14/16}$エロンガーゼの活性に依存するのに対し、後者の合成は$C_{16/18}$エロンガーゼの活性に依存する。したがって天然ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）$C_{14/16}$エロンガーゼ（配列番号９７および９８）の過剰発現は、実質的に１６：０および１６：１脂肪酸の生産を増大させ（対照株に比べて２２％の増大）、同様に天然Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）$C_{16/18}$エロンガーゼ（配列番号９４および９５）の過剰発現は、１８：０、１８：１、１８：２、および１８：３脂肪酸の生産を実質的に増大させ（対照株に比べて１８％の増大）、C_{16}脂肪酸の蓄積を低下させた（対照株に比べて２２％の減少）。もちろんここで実証され、イナガキ（Ｉｎａｇａｋｉ），Ｋ．ら著、「Ｂｉｏｓｃｉ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．」６６（３）：６１３～６２１頁（２００２年）の研究によって提案されたように、本発明のいくつかの実施形態では、異種の$C_{16/18}$エロンガーゼ（例えばドブネズミ（Ｒａｔｔｕｓ　ｎｏｒｖｅｇｉｃｕｓ）［ジェンバンク登録番号ＡＢ０７１９８６、ここでの配列番号８３および８４］および／またはＭ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）［配列番号８６および８７］か

らの）を同時発現することが有用かもしれない。したがってＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）宿主株は、ＤＨＡ生合成のために、（１）Δ６デサチュラーゼ、$C_{18/20}$エロンガーゼ、Δ５デサチュラーゼ、Δ１７デサチュラーゼまたはΔ１５デサチュラーゼのどちらか（または双方）、$C_{20/22}$エロンガーゼおよびΔ４デサチュラーゼ、または（２）Δ９エロンガーゼ、Δ８デサチュラーゼ、Δ５デサチュラーゼ、Δ１７デサチュラーゼまたはΔ１５デサチュラーゼのどちらか（または双方）、$C_{20/22}$エロンガーゼ、およびΔ４デサチュラーゼのどちらかを発現するように最低限操作されなくてはならないが、さらに好ましい実施形態では、宿主株は次の少なくとも１つをさらに含む。Δ９デサチュラーゼ、Δ１２デサチュラーゼ、$C_{14/16}$エロンガーゼおよび／または$C_{16/18}$エロンガーゼ。

【０２９８】

別の好ましい実施形態では、本発明のヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中で脂肪酸分解およびＴＡＧ分解に影響する経路が変性され、アシル－ＣｏＡプールまたはＴＡＧ画分のどちらかの細胞中に蓄積するＤＨＡの分解が最小化されうる。これらの経路は、それぞれアシル－ＣｏＡオキシダーゼおよびリパーゼ遺伝子によって代表される。より具体的にはアシル－ＣｏＡオキシダーゼ（ＥＣ１．３．３．６）はペルオキシソームβ－酸化反応を触媒し、分解の各サイクルはアセチル－ＣｏＡ分子と、脂肪酸基質よりも炭素原子２個分短い脂肪酸とを生じる。それぞれジェンバンク登録番号ＡＪ００１２９９～ＡＪ００１３０３（対応するジェンバンク登録番号ＸＰ＿５０４７０３、ＸＰ＿５０５２６４、ＸＰ＿５０３２４４、ＸＰ＿５０４４７５、およびＸＰ＿５０２１９９も参照されたい）に対応する、ＰＯＸ１、ＰＯＸ２、ＰＯＸ３、ＰＯＸ４、およびＰＯＸ５遺伝子（Ａｃｏ１、Ａｃｏ２、Ａｃｏ３、Ａｃｏ４、およびＡｃｏ５遺伝子としても知られている）によってコードされる５種のアシル－ＣｏＡオキシダーゼイソ酵素が、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中に存在する。各イソ酵素は異なる基質特異性を有し、例えばＰＯＸ３遺伝子が短鎖脂肪酸に対して活性のアシル－ＣｏＡオキシダーゼをコードするのに対し、ＰＯＸ２遺伝子はより長鎖の脂肪酸に対して活性のアシル－ＣｏＡオキシダーゼをコードする（ワング（Ｗａｎｇ），Ｈ．Ｊ．ら著、「Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．」、１８１：５１４０～５１４８頁（１９９９年））。これらの遺伝子のいずれか１つの活性を低下させまたは除去することによって、ここでの目的に有利たり得る様式で、本発明の宿主細胞中のペルオキシソームβ－酸化を修正できることが考察される。最後にいかなる混乱も避けるために、本出願人らは上述のようなアシル－ＣｏＡオキシダーゼをＰＯＸ遺伝子として言及するが、この用語は、いくつかの公的に入手できる文献に従ったＡｃｏ遺伝子命名法と同義的に使用できる。

【０２９９】

同様に、細胞内、膜結合、および細胞外酵素をはじめとするいくつかのリパーゼ（ＥＣ３．１．１．３）が、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中で検出されている（ショピナ（Ｃｈｏｕｐｉｎａ），Ａ．ら著、「Ｃｕｒｒ．Ｇｅｎｅｔ．」３５：２９７頁（１９９９年）；ピニェダ（Ｐｉｇｎｅｄｅ），Ｇ．ら著、「Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．」１８２：２８０２～２８１０頁（２０００年））。例えばＬｉｐ１（ジェンバンク登録番号Ｚ５００２０）およびＬｉｐ３（ジェンバンク登録番号ＡＪ２４９７５１）は細胞内または膜結合であり、一方Ｌｉｐ２（ジェンバンク登録番号ＡＪ０１２６３２）は細胞外リパーゼをコードする。酵素は、ＴＡＧおよび水がＤＡＧおよび脂肪酸アニオンに直接分解される反応を触媒するので、これらの各リパーゼは中断の標的である。

【０３００】

さらに代案の実施形態では、好ましいヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）宿主株中で、いくつかのホスホリパーゼの活性を操作できる。ホスホリパーゼは、膜脂質の生合成および分解において重要な役割を果たす。より具体的には「ホスホリパーゼ」という用語は、グリセロリン脂質中の１個もしくはそれ以上のエステル結合を加水分解する能力を共有する異種性酵素群を指す。全てのホスホリパーゼは基

質としてリン脂質を標的とするが、各酵素は特定のエステル結合を切断する能力を有する。したがってホスホリパーゼ命名法は個々のホスホリパーゼを区別して、リン脂質分子中の特定の結合標的を示唆する。例えばホスホリパーゼA_1（PLA_1）がグリセロール部分のｓｎ－１位で脂肪酸アシルエステル結合を加水分解するのに対し、ホスホリパーゼA_2（PLA_2）はこの分子のｓｎ－２位で脂肪酸を除去する。PLA_1（ＥＣ３．１．１．３２）およびPLA_2（ＥＣ３．１．１．４）の作用は、それぞれ遊離脂肪酸および２－アシルリゾリン脂質または１－アシルリゾリン脂質の蓄積をもたらす。ホスホリパーゼＣ（ＰＬＣ）（ＥＣ３．１．４．３）は、リン脂質主鎖中のリン酸ジエステル結合を加水分解して、１，２－ＤＡＧ、そして関与する特異的リン脂質種次第でホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミンなどを生じる（例えばPLC_1は以下の反応に関与する：１－ホスファチジル－１Ｄ－ミオ－イノシトール４，５－ビスリン酸＋H_2O＝１Ｄ－ミオ－イノシトール１，４，５－トリスリン酸＋ＤＡＧ；ＩＳＣ１はイノシトールスフィンゴリン脂質－特異的ホスホリパーゼＣをコードする［サワイ（Ｓａｗａｉ），Ｈ．ら著、「Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．」２７５、３９７９３～３９７９８頁（２０００年）］）。第２のリン酸ジエステル結合はホスホリパーゼＤ（ＰＬＤ）（ＥＣ３．１．４．４）によって切断され、ここでも関与するリン脂質のクラス次第でホスファチジン酸およびコリンまたはエタノールアミンを生じる。ホスホリパーゼＢ（ＰＬＢ）は、ｓｎ－１およびｓｎ－２脂肪酸の双方を除去する能力を有し、（脂肪酸を放出するために酵素がリン脂質［ＰＬＢ活性］およびリゾリン脂質［リゾホスホリパーゼ活性］の双方から脂肪酸を切断する）、およびリゾホスホリパーゼ－アシルトランスフェラーゼ活性（遊離脂肪酸をリゾリン脂質に転移することによって酵素がリン脂質を生成できる）の双方のヒドロラーゼを有することでユニークである。形質転換ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）宿主細胞の総油画分中に蓄積するＤＨＡの濃度を増大させるために、これらのホスホリパーゼの１個もしくはそれ以上を過剰発現することが有用かもしれない。この結果は、ホスホリパーゼがトリグリセリドの延長またはその中への組み込みのどちらかのために、アシル基をＰＣからＣｏＡプールへ放出するので観察されると仮定される。

【０３０１】

別の代案の実施形態では、全体的ＤＨＡ生合成を増大させる手段として、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）の好ましい宿主株において、ホスファチジルコリン（ＰＣ）生合成に関与するＣＤＰ－コリン経路中の酵素もまた操作できる。この技術の有用性は、ジアシルグリセロールコリンホスホトランスフェラーゼ（ＥＣ２．７．８．２）をコードするＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＣＰＴ１遺伝子の過剰発現によって実証され、それによって遺伝子操作されたＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）株においてＥＰＡ生合成増大がもたらされた。当業者はＰＣ生合成経路についてよく知っており、その他の適切な候補酵素を認識する。

【０３０２】

上述のものなどの生化学的経路を操作する方法については当業者によく知られているが、天然遺伝子の活性を低下させるまたは排除するためのいくつかの技術の概説を下で簡単に提示する。これらの技術は上述したように、天然ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）Δ１２デサチュラーゼ、ＧＰＡＴ、ＬＰＡＡＴ、ＤＧＡＴ１、ＤＧＡＴ２、ＰＤＡＴ、ＬＰＣＡＴ、アシル－ＣｏＡオキシダーゼ２（Ａｃｏ２またはＰｏｘ２）、アシル－ＣｏＡオキシダーゼ３（Ａｃｏ３またはＰｏｘ３）および／またはリパーゼ遺伝子の活性をダウンレギュレートするのに有用であろう。

【０３０３】

当業者は天然遺伝子活性を低下させまたは排除するために利用するのに最も適した技術を見極める知識を身に付けたているが、一般に、特定遺伝子の内在性活性は、例えば以下によって低下または除去できる。１．）標的遺伝子の全部または一部の挿入、置換および／または欠失を通じて遺伝子を中断する。２．）遺伝子の転写生成物にアンチセンス配列の転写のためのカセットを提供する。３．）天然に［または突然変異されて］特定遺伝子の活性がわずかまたは皆無である宿主細胞を使用する。４．）変異誘発したヘテロサブユ

ニットを過剰発現することで（すなわち２つの以上ヘテロサブユニットを含んでなる酵素中で）、「優性阻害の」の結果として酵素活性を低下させる。５．）ｉＲＮＡ技術を使用する。場合によっては望まれない遺伝子経路の阻害はまた、特異的阻害物質（例えば米国特許第４，７７８，６３０号明細書で述べられるものなどのデサチュラーゼ阻害物質）の使用を通じて達成できる。

【０３０４】

遺伝子中断では、そのコード配列を妨害し、それによって遺伝子を機能的に不活性化するために、中断させたい構造遺伝子中に外来ＤＮＡ断片（典型的に選択可能マーカー遺伝子、しかし場合により発現時に望ましい表現型を与えるキメラ遺伝子またはキメラ遺伝子クラスター）を挿入して中断させる。中断カセットの宿主細胞中への形質転換は、相同的組換えによって、機能性天然遺伝子の非機能性中断遺伝子による置換をもたらす（例えばハミルトン（Ｈａｍｉｌｔｏｎ）ら著、「Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．」１７１：４６１７～４６２２頁（１９８９年）；バルバス（Ｂａｌｂａｓ）ら著、「Ｇｅｎｅｓ」、１３６：２１１～２１３頁（１９９３年）；ゲルデナー（Ｇｕｅｌｄｅｎｅｒ）ら著、「Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．」２４：２５１９～２５２４頁（１９９６年）；およびスミス（Ｓｍｉｔｈ）ら著、「Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．」５：２７０～２７７頁（１９９６年）参照）。

【０３０５】

アンチセンス技術は、標的遺伝子配列が既知の場合に遺伝子をダウンレギュレートする別の方法である。これを達成するために、所望の遺伝子からの核酸セグメントをクローンして、ＲＮＡのアンチセンス鎖が転写されるようにプロモーターに作動可能に連結する。次にこのコンストラクトを宿主細胞に導入し、ＲＮＡのアンチセンス鎖を生成する。アンチセンスＲＮＡは、関心のあるタンパク質をエンコードするｍＲＮＡの蓄積を防止することで、遺伝子発現を阻害する。当業者は特定遺伝子の発現を低下させるために、アンチセンス技術の使用に特別な考慮が伴うことを理解する。例えばアンチセンス遺伝子の適切な発現レベルは、当業者には既知の異なる調節因子を使用した、異なるキメラ遺伝子の使用を必要とするかもしれない。

【０３０６】

配列が既知の場合、標的を定めた遺伝子中断およびアンチセンス技術が遺伝子をダウンレギュレートする効果的手段を提供するが、配列ベースではないその他のより特異性が低い方法が開発されている（例えばＵＶ放射線／化学物質による変異誘発または転位因子／トランスポゾンの使用、国際公開第０４／１０１７５７号パンフレットを参照されたい）。

【０３０７】

代案の実施形態では、特定遺伝子の内在性活性はタンパク質発現を調節する制御配列を操作することで低下できる。技術分野でよく知られているように、コード配列に関連づけられた制御配列としては、コード配列上流（５’非コード配列）、中、または下流（３’非コード配列）に位置して、転写、ＲＮＡプロセシングまたは安定性、または関連コード配列の翻訳に影響する、転写および翻訳「調節」ヌクレオチド配列が挙げられる。したがって特定遺伝子の制御配列の操作とは、遺伝子のプロモーター、翻訳リーダー配列、イントロン、エンハンサー、開始制御領域、ポリアデニル化認識配列、ＲＮＡプロセシング部位、エフェクター結合部位、およびステムループ構造の操作を指してもよい。したがって例えばＤＡＧ ＡＴの発現をダウンレギュレートするために、ＤＡＧ ＡＴのプロモーターを消去または中断し、それによって脂質および油生合成速度を低下できる。代案としては、ＤＡＧ ＡＴの発現を駆動する天然プロモーターを、天然プロモーターと比べて低下したプロモーター活性を有する異種のプロモーターで置換できる。制御配列を操作するのに有用な方法については、当業者によく知られている。

【０３０８】

要約すると、ここで提供される教示を使用して、形質転換体油性微生物宿主は微生物宿主の総脂質の少なくとも約５％のＥＰＡ、好ましくは総脂質の少なくとも約１０％のＥＰ

Ａ、より好ましくは総脂質の少なくとも約１５％のＥＰＡ、より好ましくは総脂質の少なくとも約２０％のＥＰＡ、より好ましくは総脂質の少なくとも約２５～３０％のＥＰＡ、より好ましくは総脂質の少なくとも約３０～３５％のＥＰＡ、より好ましくは少なくとも約３５～４０％、そして最も好ましくは総脂質の少なくとも約４０～５０％のＥＰＡを生成する。

【０３０９】

要約すると、ここで提供される教示を使用して、形質転換油性微生物宿主は、全脂質中に少なくとも約５％のＤＨＡ、より好ましくは全脂質中に少なくとも約１０％のＤＨＡ、より好ましくは全脂質中に少なくとも約１５％のＤＨＡ、より好ましくは全脂質中に少なくとも約２０％のＤＨＡ、最も好ましくは全脂質中に少なくとも約２５～３０％のＤＨＡを生成するであろう。

【０３１０】

ＤＨＡ合成のための発酵プロセス

形質転換された微生物宿主細胞は、キメラ遺伝子の発現（例えばデサチュラーゼ、エロンガーゼ、アシルトランスフェラーゼなどをコードする）を最適化する条件下で生育させて、最大かつ最も経済的なＤＨＡ収率を生じさせる。一般に最適化されてもよい培地条件としては、炭素源のタイプおよび量、窒素源のタイプおよび量、炭素－対－窒素比、酸素レベル、生育温度、ｐＨ、バイオマス生成相の長さ、油蓄積相の長さ、および細胞収穫時間が挙げられる。ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）は、一般に複合培地（例えば酵母菌抽出物－ペプトン－デキストロース液体培地（ＹＰＤ））で、または生育に必要な構成要素が欠如することで所望の発現カセットの選択を強要する合成最少培地（例えばミシガン州デトロイトのディフコ・ラボラトリーズ（ＤＩＦＣＯ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（Ｄｅｔｒｏｉｔ，ＭＩ））からの酵母菌窒素ベース）上で生育させる。

【０３１１】

本発明における発酵培地は、適切な炭素源を含有しなくてはならない。適切な炭素源としては、単糖類（例えばグルコース、フルクトース）、二糖類（例えばラクトース、スクロース）、少糖類、多糖類（例えばデンプン、セルロースまたはそれらの混合物）、糖アルコール（例えばグリセロール）または再生可能原材料からの混合物（例えば乳清透過液、コーンスティープリーカー、甜菜モラセス、大麦の麦芽）が挙げられるが、これに限定されるものではない。さらに炭素源としては、アルカン、脂肪酸、脂肪酸エステル、モノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリド、リン脂質、および植物油（例えばダイズ油）および動物脂肪をはじめとする脂肪酸の様々な商業的供給源が挙げられる。さらに炭素源としては、重要な生化学的中間体への代謝変換が実証されている一炭素源（例えば二酸化炭素、メタノール、ホルムアルデヒド、ホルメート、および炭素含有アミン）が挙げられる。したがって本発明で使用される炭素源は、多種多様な炭素含有源を包含することが考察される。上述の全ての炭素源およびそれらの混合物が本発明で適切であることが期待されるが、好ましい炭素源は糖および／または脂肪酸である。最も好ましいのは、１０～２２個の炭素を含有するグルコースおよび／または脂肪酸である。

【０３１２】

窒素は、無機（例えば（NH_4）$_2SO_4$）または有機（例えば尿素またはグルタミン酸）源から供給されてもよい。適切な炭素および窒素源に加えて、発酵培地はまた、適切なミネラル、塩、補助因子、緩衝液、ビタミン、および油性酵母の生育と、ＤＨＡ生成に必須の酵素的経路の促進とに適した、当業者に既知であるその他の構成要素を含有しなくてはならない。脂質およびＰＵＦＡの合成を促進するいくつかの金属イオン（例えばMn^{+2}、Co^{+2}、Zn^{+2}、Mg^{+2}）が注目されている（Ｄ．Ｊ．カイル（Ｋｙｌｅ）およびＲ．コリン（Ｃｏｌｉｎ）編、「単細胞油の工業的応用（Ｉｎｄ．Ａｐｐｌ．Ｓｉｎｇｌｅ　Ｃｅｌｌ　Ｏｉｌｓ）」より、ナカハラ（Ｎａｋａｈａｒａ）Ｔ．ら著、６１～９７頁（１９９２年））。

【０３１３】

本発明における好ましい増殖培地は、ミシガン州デトロイトのディフコ・ラボラトリーズ（ＤＩＦＣＯ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（Ｄｅｔｒｏｉｔ，ＭＩ））からの酵母菌窒素ベースなどの一般的な市販の調製培地である。その他の合成または人工増殖培地もまた使用されてもよく、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）の生育に適する培地は、微生物学または発酵科学の当業者に知られている。発酵に適したｐＨ範囲は、典型的に約ｐＨ４．０～ｐＨ８．０の間であり、ｐＨ５．５～ｐＨ７．０が初期生育条件の範囲として好ましい。発酵は好気性または好気性条件下で実施されてもよく、微好気条件が好ましい。

【０３１４】

典型的に油性酵母菌細胞中のＰＵＦＡの高レベルの蓄積は、代謝状態が生育と脂肪合成／貯蔵との間で「平衡状態」でなくてはならないので、二段階プロセスを必要とする。したがって最も好ましくは、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）におけるＤＨＡ生成には、二段階発酵プロセスが必要である。このアプローチについては国際公開第２００４／１０１７５７号パンフレットで述べられ、様々な適切な発酵プロセスデザイン（すなわちバッチ、供給バッチ、および連続）および成育中の考察についても同様に述べられる。

【０３１５】

ＤＨＡの精製および加工

ＤＨＡをはじめとするＰＵＦＡは、遊離脂肪酸として、またはアシルグリセロール、リン脂質、スルホリピドまたは糖脂質などのエステル化形態で宿主微生物中に見いだすことができ、技術分野でよく知られている多様な手段を通じて宿主細胞から抽出されてもよい。酵母菌脂質の抽出技術、品質分析、および許容性基準についての１つのレビューは、Ｚ．ジェーコブス（Ｊａｃｏｂｓ）著、「Ｃｒｉｔｉｃａｌ　Ｒｅｖｉｅｗｓ　ｉｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ」　１２（５／６）：４６３～４９１頁（１９９２年）である。下流プロセスに関する簡潔なレビューはまた、Ａ．シン（Ｓｉｎｇｈ）およびＯ．ワード（Ｗａｒｄ）著、「Ａｄｖ．Ａｐｐｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．」４５：２７１～３１２頁（１９９７年）にもある。

【０３１６】

一般にＤＨＡおよびその他のＰＵＦＡの精製手段は、有機溶剤、超音波処理、（例えば二酸化炭素を使用した）超臨界流体抽出による抽出と、鹸化と、圧搾などの物理的手段またはそれらの組み合わせを含んでもよい。追加的詳細については、国際公開第２００４／１０１７５７号パンフレットの教示を参照されたい。

【０３１７】

脱酸されたおよび／または精製されたＤＨＡを含有する油は、水素化することで、様々な融解特性およびテクスチャがある脂肪をもたらすことができる。スプレッド、製菓用脂肪、硬質バター、マーガリン、ベーキングショートニングなどをはじめとする多くの加工脂肪は、室温で異なる程度の固形性を必要とし、油源の物理特性の改変のみを通じて製造できる。これは触媒的水素付加を通じて最も一般的に達成できる。

【０３１８】

水素付加はニッケルなどの触媒の助けによって、水素が不飽和脂肪酸二重結合に付加される化学反応である。水素付加は、２つの主要効果を有する。第１に不飽和脂肪酸含量減少の結果として、油の酸化安定性が増大する。第２に脂肪酸変性が融点を上昇させて室温で半液体または固体の脂肪がもたらされるので、油の物理特性が変化する。

【０３１９】

水素付加反応に影響する多くの変数があり、それは次に最終生成物の組成を変化させる。圧力、温度、触媒タイプおよび濃度、撹拌および反応器設計をはじめとする操作条件は、調節できるより重要なパラメーターである。選択的水素付加条件を使用して、より低不飽和のものに優先して、より高不飽和の脂肪酸を水素化できる。非常に軽いまたはブラシ水素付加（ｂｒｕｓｈ　ｈｙｄｒｏｇｅｎａｔｉｏｎ）を用いて、液体油の安定性を増大させることが多い。さらに水素付加は液体油を物理的に固形の脂肪に変換する。水素付加

の度合いは特定の最終産物のためにデザインされた、所望の性能および融解特性に左右される。ベーキング製品を製造するのに使用される液体ショートニング、市販の揚げ物およびロースト操作のために使用される固体脂肪およびショートニング、およびマーガリン製造のためのベースストックは、水素付加を通じて達成される無数の可能な油および脂肪製品の例である。水素付加および水素化製品のより詳細な説明は、パターソン（Ｐａｔｔｅｒｓｏｎ），Ｈ．Ｂ．Ｗ．著、「脂肪および油の水素付加：理論および実線（Ｈｙｄｒｏｇｅｎａｔｉｏｎ ｏｆ Ｆａｔｓ ａｎｄ Ｏｉｌｓ：Ｔｈｅｏｒｙ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ）」、米国油化学会、１９９４年、にある。

【０３２０】

食材で使用するためのＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）のＤＨＡ生成株

市場は、現在、ω－３および／またはω－６脂肪酸（特にＡＲＡ、ＥＰＡ、およびＤＨＡ）を組み込んだ多種多様な食物および飼料製品を下支えしている。ＤＨＡを含んでなる本発明の酵母微生物油は、食物および飼料製品で機能して、現行の調合物に健康上の利点を与えることが考察される。

【０３２１】

ここで述べられる酵母宿主によって生成されるω－３および／またはω－６脂肪酸を含有する微生物油は、食物類似物、肉製品、穀物製品、ベーカリー食品、スナック食品、および乳製品をはじめとするが、これに限定されるものではない、多様な食物および飼料製品で使用するのに適している。さらに本微生物油を調合物中で使用して、医学的栄養物、栄養補助食品、乳児用調製粉乳をはじめとするメディカルフード、ならびに医薬品に健康上の利点を与えてもよい。食品加工および食品配合の当業者は、特定量と組成の微生物油をどのように食品または飼料製品に添加してもよいかを理解する。このような量はここで「有効」量と称され、食品または飼料製品、製品が栄養補給を意図する食餌、またはメディカルフードまたは医学的栄養物が矯正または処置を意図する疾患に左右される。

【０３２２】

食物類似物は、当業者によく知られているプロセスを使用して作り出すことができる。肉類似物、チーズ類似物、ミルク類似物などが挙げられる。ダイズからできた肉類似物は、ダイズタンパク質または豆腐、および共に混合されて、様々な種類の肉をシミュレートするその他の成分を含有する。これらの肉代用品は、冷凍、缶詰または乾燥食品として販売される。通常、それらはそれらが置き換える食品と同じように使用できる。肉類似物例としては、ハム類似物、ソーセージ類似物、ベーコン類似物などが挙げられるが、これに限定されるものではない。

【０３２３】

食物類似物は、それらの機能性および組成特性次第で模造品または代用品として分類できる。例えば模造チーズは、それが置き換えるようにデザインされたチーズに似てさえいればよい。しかし製品は一般に、それが置き換えるチーズと栄養的に同等であり、そのチーズに対する最小組成要求量を満たす場合にのみ代用チーズと称することができる。したがって代用品チーズは模造チーズよりも高いタンパク質レベルを有することが多く、ビタミンおよびミネラルで強化される。

【０３２４】

ミルク類似物または非乳製品食品としては、模造ミルクおよび非乳製品冷菓（例えばダイズおよび／またはダイズタンパク質製品からできたもの）が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【０３２５】

肉製品は、幅広い製品を包含する。米国では「肉」は、牛、豚、および羊から産する「赤身肉」を含む。赤身肉に加えて、鶏、七面鳥、アヒル、ホロホロチョウ、カモを含む家禽品目、および魚および貝類がある。生、塩蔵、および揚げ物、および塩蔵され調理された幅広い種類の調味および加工肉製品がある。ソーセージおよびホットドッグは、加工肉製品の例である。したがって「肉製品」という用語は、ここでの用法では加工肉製品を含むが、これに限定されるものではない。

【０３２６】
シリアル食品はシリアル穀物の加工に由来する食品である。シリアル穀物としては、可食穀物（種子）を産するイネ科のあらゆる植物が挙げられる。最も普及している穀物は、大麦、コーン、雑穀、オート麦、キノア、米、ライ麦、モロコシ、ライ小麦、小麦、およびワイルドライスである。実施シリアル食品の例としては、全粒、破砕粒、挽き割り、穀粉、ふすま、胚芽、朝食用シリアル、押し出し食品、パスタなどが挙げられるが、これに限定されるものではない。
【０３２７】
ベーカリー製品は、上で言及され、ベーキングに匹敵する様式で、天火焼または加工された、すなわち熱に曝すことで乾燥または硬化されるあらゆるシリアル食品を含んでなる。ベーカリー製品の例としては、パン、ケーキ、ドーナツ、バー、パスタ、パン粉、ベークドスナック、ミニビスケット、ミニクラッカー、ミニクッキー、およびミニープレッツェルが挙げられるが、これに限定されるものではない。上述されるように、成分として本発明の油を使用できる。
【０３２８】
スナック食品は、上または下で述べられる食品のいずれかを含んでなる。
【０３２９】
揚げ物食品は、油で揚げた上または下で述べられる食品のいずれかを含んでなる。
【０３３０】
飲料は、液体または乾燥粉末形態であることができる。
【０３３１】
例えば非炭酸飲料と、生、冷凍、缶詰または濃縮果汁のフルーツジュースと、フレーバーミルクまたはプレーンミルク飲料などが挙げられる。成人および幼児栄養フォーミュラについては技術分野でよく知られ、市販されている（例えばアボット・ラボラトリーズのロス製品部門（Ｒｏｓｓ　Ｐｒｏｄｕｃｔ　Ｄｉｖｉｓｉｏｎ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）からのシミラック（Ｓｉｍｉｌａｃ）（登録商標）、エンシュア（Ｅｎｓｕｒｅ）（登録商標）、ジュビディ（Ｊｅｖｉｔｙ）（登録商標）、およびアリメンタム（Ａｌｉｍｅｎｔｕｍ）（登録商標））。乳児用調製粉乳は、幼児および小児に食べさせる液体または戻した粉末である。それらは人乳の代替え品の役割をする。乳児用調製粉乳は幼児にとって唯一の栄養源であることが多いので、幼児の食餌において特別な役割を有する。母乳が幼児にとってなおも最良の栄養であるが、乳児用調製粉乳は、乳児が生育するだけでなく生長できる十分近い次善の策である。乳児用調製粉乳は、人乳にますます近くなってきている。
【０３３２】
乳製品はミルク由来製品である。ミルク類似物または非乳製品は、例えば上述した豆乳のようなミルク以外の供給源に由来する。これらの製品としては、全乳、スキムミルク、ヨーグルトまたはサワーミルクなどの発酵ミルク製品、クリーム、バター、練乳、粉ミルク、コーヒーホワイトナー、コーヒークリーマー、アイスクリーム、チーズなどが挙げられるが、これに限定されるものではない。
【０３３３】
その中に本発明のＤＨＡ含有油を含めることができる追加的食品としては、例えばチューインガム、糖菓およびフロスティング、ゼラチンおよびプディング、ハードおよびソフトキャンディ、ジャムおよびゼリー、白色グラニュー糖、糖代用品、甘みソース、トッピングおよびシロップ、および乾燥ブレンド混合粉体が挙げられる。
【０３３４】
健康食品および医薬品
健康食品は健康上の利点を与えるあらゆる食品であり、機能性食品、メディカルフード、医学的栄養剤、および栄養補助食品が含まれる。さらに本発明の微生物油を標準医薬組成物で使用してもよい。本遺伝子操作ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）株、またはそれから産生するＤＨＡを含んでなる微生物油は、上述

のあらゆる食品中に容易に組み込んで、それによって例えば機能性食品またはメディカルフードが生成できる。例えばＤＨＡを含んでなるより濃縮された調合物としては、ヒトまたはヒト以外の動物において、栄養補助食品として使用できるカプセル、粉末、錠剤、ソフトジェル、ジェルキャップ、濃縮液、およびエマルジョンが挙げられる。

【０３３５】

栄養補助食品における使用

ＤＨＡを含んでなるより濃縮された調合物としては、ヒトまたはヒト以外の動物において、栄養補助食品として使用できるカプセル、粉末、錠剤、ソフトジェル、ジェルキャップ、濃縮液、およびエマルジョンが挙げられる。特に本発明のＤＨＡ油は、乳児用調製粉乳または離乳食などの栄養補助食品への組み込みに特に適している。

【０３３６】

乳児用調製粉乳は、幼児および小児に食べさせる液体または戻した粉末である。「乳児用調製粉乳」とは、ここで幼児の哺乳において人乳に置き換えることができ、典型的に水溶液中で所望の百分率の炭水化物およびタンパク質と混合された所望の百分率の脂肪から構成される経腸栄養製品と定義される（例えば米国特許第４，６７０，２８５号明細書を参照されたい）。世界的組成研究ならびに専門家グループによって規定されるレベルに基づいて、平均的人乳は典型的に約０．２０％～０．４０％の全脂肪酸（脂肪からの熱量が約５０％と仮定すれば）を含有し、一般にＤＨＡとＡＲＡの比率は約１：１～１：２の範囲である（例えばミード・ジョンソン・アンド・カンパニー（Ｍｅａｄ　Ｊｏｈｎｓｏｎ　＆　Ｃｏｍｐａｎｙ）からのエンファミル（Ｅｎｆａｍｉｌ）ＬＩＰＩＬ（商標）およびアボット・ラボラトリーズのロス製品部門（Ｒｏｓｓ　Ｐｒｏｄｕｃｔ　Ｄｉｖｉｓｉｏｎ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）からのシミラック・アドバンス（Ｓｉｍｉｌａｃ　Ａｄｖａｎｃｅ）（商標）の配合を参照されたい）。乳児用調製粉乳は幼児にとって唯一の栄養源であることが多いので、幼児の食餌において特別な役割を有し、母乳が幼児にとってなおも最良の栄養であるが、乳児用調製粉乳は、乳児が生育するだけでなく生長できる十分近い次善の策である。

【０３３７】

動物飼料における使用

動物飼料はここで総称的に、ヒト以外の動物飼料としての使用または飼料への混合が意図される製品と定義される。そして、上で記載したように、本発明のＤＨＡ含有油は、様々な動物飼料中の成分として使用できる。

【０３３８】

より具体的には、これに限定されるものではないが、本発明の油は、ペットフード、反芻動物および家禽飼料製品、および水産養殖飼料製品で使用できる。ペットフードはペット［例えば犬、猫、鳥、爬虫類、齧歯類］に食べさせることが意図される製品であり、これらの製品は上のシリアルおよび健康食品、ならびに肉および肉副産物、ダイズタンパク質製品、牧草および干し草生成物（例えばアルファルファ、チモシー、カラスムギまたはスズメノチャヒキ、野菜）を含むことができる。反芻動物および家禽食品は、例えば七面鳥、鶏、牛、および豚に食べさせることが意図される製品である。上のペットフードと同様に、これらの製品は、上に列挙したシリアルおよび健康食品、ダイズタンパク質製品、肉および肉副産物、および牧草および干し草製品を含むことができる。そして、水産養殖飼料（または「アクアフィード」）は、淡水または海水生物および／または動物の繁殖、養殖または飼育に関わる養殖で使用されることが意図される製品である。

【０３３９】

高濃度のＡＲＡ、ＥＰＡおよび／またはＤＨＡを生成する本遺伝子操作ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）株は、ほとんどの動物飼料配合に含めるのに特に有用であることが考察される。必要なω－３および／またはω－６ＰＵＦＡを提供するのに加えて、酵母それ自体が、全体的な動物の健康および栄養に寄与できる有用なタンパク質およびその他の食物栄養素源（例えばビタミン、ミネラル、核酸、複合糖質など）であり、ならびに調合物の美味性を増大する。より具体的には、ヤロウィア

・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）（ＡＴＣＣ＃２０３６２）は、乾燥細胞重量に対するパーセントとして以下のおよその化学組成を有する、３５％のタンパク質、４０％の脂質、１０％の炭水化物、５％の核酸、５％の灰分、および５％の水分。さらに炭水化物画分内では、β－グルカンがおよそ４５．６ｍｇ／ｇを構成し、マンナンがおよそ１１．４ｍｇ／ｇを構成し、キチンがおよそ５２．６ｍｇ／ｇを構成する（一方トレハロースは微量構成要素である［およそ０．７ｍｇ／ｇ］）。

【０３４０】

かなり多数の文献が、β－グルカン、マンナン、およびキチンの免疫調節効果について調査している。細菌および真菌細胞壁の主要構成要素であるβ－グルカンが、それによって非特異的免疫を刺激する（すなわち「免疫賦活効果」）ことで水産養殖種、ペットおよび家畜およびヒトの健康を改善する手段について最もよく研究されているが、キチンおよびマンナンの双方が同様に有用な免疫賦活剤として認識されている。単純化すると、これらのβ－１，３－Ｄ－ポリグルコース分子は白血球細胞（例えばマクロファージ、好中球、および単球）の生成を非特異的様式で刺激し、それによって多様な病原体抗原または環境ストレス要因に対する感度および防御を増大させるので、免疫応答の全体的改良はβ－グルカンの使用によって達成できる。より具体的には、多数の研究が以下のβ－グルカンの機能を実証している。ウィルス性、細菌、真菌、および寄生虫性感染に対する増強された保護を与え、抗生物質およびワクチンと共に使用されるとアジュバント効果を発揮し、創傷治癒を増強し、遊離ラジカルに起因する損傷に対処し、腫瘍の緩解を増強し、細菌内毒素の毒性を和らげ、粘膜免疫を強化する（ラー（Ｒａａ），Ｊ．ら著、「ノルウェーβ－グルカン研究、自然薬品の臨床応用。免疫：抑制、機能不全、および欠損（Ｎｏｒｗｅｇｉａｎ　Ｂｅｔａ　Ｇｌｕｃａｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ　ｏｆ　Ｎａｔｕｒａｌ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ．Ｉｍｍｕｎｅ：Ｄｅｐｒｅｓｓｉｏｎｓ　Ｄｙｓｆｕｎｃｔｉｏｎ　＆　Ｄｅｆｉｃｉｅｎｃｙ）」（１９９０年）でレビューされている）。伝統的畜産業および水産養殖セクター内の双方における酵母β－グルカン、マンナン、およびキチンの有用性について記述している現行の文献の例としては、以下が挙げられる。Ｌ．Ａ．ホワイト（Ｗｈｉｔｅ）ら著、「Ｊ．Ａｎｉｍ．Ｓｃｉ．」８０：２６１９～２６２８頁（２００２年）、離乳ブタにおける栄養補給；Ｋ．Ｓ．スワンソン（Ｓｗａｎｓｏｎ）ら著、「Ｊ．Ｎｕｔｒ．」１３２：９８０～９８９頁（２００２年）、犬における栄養補給；Ｊ．オルトゥー（Ｏｒｔｕｎｏ）ら著、「Ｖｅｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｏｎｏｐａｔｈ．」８５：４１～５０頁（２００２年）、ヨーロッパヘダイに投与されたホール・サッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）；Ａ．ロドリゲス（Ｒｏｄｒｉｇｕｅｚ）ら著「Ｆｉｓｈ　Ｓｈｅｌｌ．Ｉｍｍｕｎｏ．」１６：２４１～２４９頁（２００４年）、ヨーロッパヘダイに投与されたホール・ムコール・シルシネロイデス（Ｍｕｃｏｒ　ｃｉｒｃｉｎｅｌｌｏｉｄｅｓ）；Ｍ．バグニ（Ｂａｇｎｉ）ら（「Ｆｉｓｈ　Ｓｈｅｌｌ．Ｉｍｍｕｎｏ．」１８：３１１～３２５頁（２００５年））、β－グルカンを含有する酵母抽出物によるスズキの栄養補給；クルス－スアレス（Ｃｒｕｚ－Ｓｕａｒｅｚ），Ｌ．Ｅ．、リック－マリー（Ｒｉｃｑｕｅ－Ｍａｒｉｅ），Ｄ．、タピア－サラザール（Ｔａｐｉａ－Ｓａｌａｚａｒ），Ｍ．、オリヴェラ－ノヴォア（Ｏｌｖｅｒａ－Ｎｏｖｏａ），Ｍ．Ａ．およびシヴェラ－セレセード（Ｃｉｖｅｒａ－Ｃｅｒｅｃｅｄｏ），Ｒ．編、「（水産栄養学における進歩５、第５回水産栄養４シンポジウム紀要（Ａｖａｎｃｅｓ　ｅｎ　Ｎｕｔｒｉｃｉｏｎ　Ａｃｕｉｃｏｌａ　Ｖ．Ｍｅｍｏｒｉａｓ　ｄｅｌ　Ｖ　Ｓｉｍｐｏｓｉｕｍ　Ｉｎｔｅｒｎａｃｉｏｎａｌ　ｄｅ　Ｎｕｔｒｉｃｉｏｎ　Ａｃｕｉｃｏｌａ）、２０００年１１月１９～２２日、メキシコ国ユカタン州メリダ）より、Ｊ．ラー（Ｒａａ）著、魚および貝類飼料における免疫賦活剤の使用に関するレビュー。

【０３４１】

ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）のユニークなタンパク質：脂質：炭水化物組成、ならびにユニークな複合糖質プロフィール（１：４：４．６の比率でマンナン：β－グルカン：キチンを含んでなる）に基づいて、本発明の遺

伝子改変酵母細胞（またはその一部）が、動物飼料配合に対する有用な添加剤になり得ることが考察された（例えばホール［凍結乾燥］酵母細胞として、精製された細胞壁として、精製された酵母炭水化物として、または様々なその他の分画された形態で）。

【０３４２】

水産養殖産業については、様々な魚種の栄養所要量に対する理解の高まり、および飼料製造における技術的進歩が、水産養殖産業における栄養補給または天然飼料を置き換えるための人造または人工飼料（配合飼料）の開発および使用を可能にした。しかし一般に、魚のための水産養殖飼料に含まれる様々な栄養素の一般的割合（乾燥飼料に対するパーセント）は、３２～４５％のタンパク質、４～２８％の脂肪（その内少なくとも１～２％はω－３および／またはω－６ＰＵＦＡである）、１０～３０％の炭水化物、１．０～２．５％のミネラル、および１．０～２．５％のビタミンを含む。多様なその他の成分も場合により調合物に添加されてもよい。これらとしては、（１）特にサケ科および鑑賞「水槽」魚のために、肉および皮膚の着色をそれぞれ増強するカロチノイド、（２）ペレットに安定性を提供し、栄養素（例えば牛心臓肉、デンプン、セルロース、ペクチン、ゼラチン、アラビアゴム、ローカストビーン、寒天、カラゲニン、およびその他のアルギン酸塩）の水中への浸出を減少させる結合剤、（３）魚飼料の貯蔵寿命を延長し、脂肪酸敗を低下させる抗菌剤および抗酸化剤などの保存料（例えばビタミンＥと、ブチル化ヒドロキシアニソールと、ブチル化ヒドロキシトルエンと、エトキシキンと、プロピオン酸、安息香酸またはソルビン酸のナトリウムおよびカリウム塩）、（４）飼料の美味性および摂取を増強する化学誘引剤および香味料、および（５）その他の飼料原料が挙げられる。これらのその他の飼料原料としては、繊維および灰分（それぞれ充填材としておよびカルシウムおよびリン源として使用するための）、および食餌の栄養価を増強し、魚によるその受容性を高めるための植物質および／または魚粉または粉末イカ（例えば生、冷凍または乾燥藻類、鹹水エビ、ワムシまたはその他の動物性プランクトン）などの材料が挙げられる。「魚の栄養所要量（Ｎｕｔｒｉｅｎｔ　Ｒｅｑｕｉｒｅｍｅｎｔｓ　ｏｆ　Ｆｉｓｈ）」（米国学術研究会議、全米アカデミー：Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ　Ｄ．Ｃ．、１９９３年）は、魚の必須栄養素および様々な成分の栄養素含量の詳細な説明を提供する。

【０３４３】

完全な食餌は、栄養的にバランスがとれており、美味で、水安定性でなくてはならず、適切なサイズおよびテクスチャを有さねばならないので、アクアフィード調合物の製造には多様な要素の検討を要する。アクアフィードの栄養組成に関しては、「水産養殖飼料成分ハンドブック（Ｈａｎｄｂｏｏｋ　ｏｎ　Ｉｎｇｒｅｄｉｅｎｔｓ　ｆｏｒ　Ａｑｕａｃｕｌｔｕｒｅ　Ｆｅｅｄｓ）」ヘルトランプ（Ｈｅｒｔｒａｍｐｆ），Ｊ．Ｗ．およびＦ．ピエダッドーパスカル（Ｐｉｅｄａｄ－Ｐａｓｃｕａｌ）著、Ｋｌｕｗｅｒ　Ａｃａｄｅｍｉｃ：Ｄｏｒｄｒｅｃｈｔ，Ｔｈｅ　Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ、２０００年、および「養殖魚およびエビの栄養と給餌の標準法（Ｓｔａｎｄａｒｄ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｆｏｒ　ｔｈｅ　Ｎｕｔｒｉｔｉｏｎ　ａｎｄ　Ｆｅｅｄｉｎｇ　ｏｆ　Ｆａｒｍｅｄ　Ｆｉｓｈ　ａｎｄ　Ｓｈｒｉｍｐ）」タコン（Ｔａｃｏｎ），Ａ．Ｇ．Ｊ．著、Ａｒｇｅｎｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ：Ｒｅｄｍｏｎｄ、１９９０年を参照されたい。一般に餌は、乾燥（すなわち最終含水量６～１０％）、半湿潤（すなわち含水量３５～４０％）または湿潤（すなわち含水量５０～７０％）であるように調合される。乾燥飼料としては、乾燥成分の単純なルースな混合物（すなわち「粉餌」または「ミール」）と、圧縮ペレット、クランブルまたは顆粒と、フレークとが挙げられる。魚の給餌要件次第で、ペレットは沈降しまたは浮遊するようにできる。半湿潤および湿潤飼料は単一または混合成分（例えば雑魚または調理マメ）から作られ、ケークまたはボールに成形できる。

【０３４４】

高濃度のＤＨＡを生成する本遺伝子操作ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）株が、ほとんどの水産養殖飼料に含めるのに特に有用であることが考察される。必要なω－６ＰＵＦＡを提供するのに加えて、酵母それ自体が、調合物の美味性を増大できる有用なタンパク質源である。代案の実施形態では、本Ｙ．リポリテ

ィカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）株によって生成される油を細胞集団からの抽出および精製に続いて、水産養殖飼料配合中に直接導入できる。

【０３４５】

本発明は、油性酵母ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）の全脂質画分中に５．６％までのＤＨＡの合成を実証する。図５に示すように、様々な遺伝子を野生型Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＴＣＣ＃２０３６２に組み込んで、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）の多数の株が作り出され、各形質転換体株は異なる量のＰＵＦＡ（ＤＨＡを含む）を生成できた。いくつかの代表的な形質転換生物の完全な脂質プロフィールを下の表１０に示す。エロンガーゼは、次のような短縮命名法を使用して同定される。C_{18}ＥＬ１は高親和力$C_{18/20}$エロンガーゼ（ＥＬＯ１）を指し、C_{18}ＥＬ２は$C_{18/20}$エロンガーゼ（ＥＬＯ２）を指し、C_{16}ＥＬは$C_{16/18}$エロンガーゼを指し、C_{20}ＥＬは$C_{20/22}$エロンガーゼを指す。脂肪酸は１６：０、１６：１、１８：０、１８：１（オレイン酸）、１８：２（ＬＡ）、ＧＬＡ、ＤＧＬＡ、ＡＲＡ、ＥＴＡ、ＥＰＡ、ＤＰＡ、およびＤＨＡとして同定され、各組成は全脂肪酸の％として表される。「脂質％ｄｃｗ」とは、乾燥細胞重量を基準にして測定される細胞中の脂質百分率を表す。

【０３４６】

【表２０】

表10

ω-6Δ6デサチュラーゼ/Δ6エロンガーゼ経路を発現する代表的なヤロウィア・リポリティカ株の脂質プロフィール

株	付加遺伝子数									遺伝子KO	脂肪酸含量										脂質% dcw
	Δ12	Δ6	C_{18} EL1	C_{18} EL2	Δ5	Δ17	C_{16} EL	Δ4	C_{20} EL		16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	GLA	DGLA	ARA	ETA	EPA	DPA	DHA	
M4	1	1	1	1	--	--	--	--	--	*Ura*	15	4	2	5	27	35	8	0	0	0	--	--	--
EU	1	1	1	1	2	3	--	--	--	*Aco3 Ura*	19	10.3	2.3	15.8	12	18.7	5.7	0.2	3	10.3	--	--	36
Y2072	2	1	2	1	4	3	1	--	--	*Aco3 Δ12*	7.6	4.1	2.2	16.8	13.9	27.8	3.7	1.7	2.2	15	--	--	--
Y2089	3	2	3	1	5	3	2	--	--	“	7.9	3.4	2.5	9.9	14.3	37.5	2.5	1.8	1.6	17.6	--	--	--
Y2098	3	2	3	1	5	3	2	--	--	“	8.4	1.3	2	7.2	11	24.6	4.3	1.2	2.4	25.6	--	--	--
Y3000	3	2	3	1	5	3	3	1	1	“	5.9	1.2	5.5	7.7	11.7	30.1	2.6	1.2	1.2	4.7	18.3	5.6	--

【０３４７】

上の表に示されるように、ＤＨＡ生成株は、下記の遺伝的改変を含んでなった（完全な詳細は実施例で提供される）。
（１）ＦＢＡ：：Ｆ．Δ１２：：ＬＩＰ２およびＴＥＦ：：Ｆ．Δ１２：：ＰＥＸ１６キメラ遺伝子内における、２コピーのフザリウム・モニリフォルメ（Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｍｏｎｉｌｉｆｏｒｍｅ）Δ１２デサチュラーゼの発現、
（２）ＦＢＡＩＮ：：Ｍ．Ｄ１２：：ＰＥＸ２０キメラ遺伝子内における、１コピーのモルティエラ・イザベリナ（Ｍｏｒｔｉｅｒｅｌｌａ ｉｓａｂｅｌｌｉｎａ）Δ１２デサチュラーゼの発現、
（３）ＴＥＦ：：Δ６Ｓ：：ＬＩＰ１およびＦＢＡＩＮ：：Δ６Ｓ：：ＬＩＰ１キメラ遺伝子内における、モルティエラ・アルピナ（Ｍｏｒｔｉｅｒｅｌｌａ ａｌｐｉｎａ）Δ６デサチュラーゼ由来の２コピーの合成Δ６デサチュラーゼ遺伝子（Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中での発現のためにコドン最適化された）の発現、
（４）ＦＢＡＩＮ：：ＭＡΔ５Ｓ：：ＰＥＸ２０およびＴＥＦ：：ＭＡΔ５Ｓ：：ＬＩＰ１キメラ遺伝子内における、２コピーのモルティエラ・アルピナ（Ｍｏｒｔｉｅｒｅｌｌａ ａｌｐｉｎａ）Δ５デサチュラーゼの発現、
（５）ＴＥＦ：：Ｈ．Ｄ５Ｓ：：ＰＥＸ１６およびＧＰＡＴ：：Ｈ．Ｄ５Ｓ：：ＰＥＸ２０キメラ遺伝子内における、ヒト（Ｈｏｍｏ ｓａｐｉｅｎｓ）Δ５デサチュラーゼ由来の２コピーの合成Δ５デサチュラーゼ遺伝子（Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中での発現のためにコドン最適化された）の発現、
（６）ＴＥＦ：：Ｉ．Ｄ５Ｓ：：ＰＥＸ２０キメラ遺伝子内における、イソクリシス・ガルバナ（Ｉｓｏｃｈｒｙｓｉｓ ｇａｌｂａｎａ）Δ５デサチュラーゼ由来の１コピーの合成Δ５デサチュラーゼ遺伝子（Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中での発現のためにコドン最適化された）の発現、
（７）ＦＢＡＩＮ：：Δ１７Ｓ：：ＬＩＰ２、ＴＥＦ：：Δ１７Ｓ：：ＰＥＸ２０、およびＦＢＡＩＮｍ：：Δ１７Ｓ：：ＰＥＸ１６キメラ遺伝子内における、サプロレグニア・ディクリナ（Ｓａｐｒｏｌｅｇｎｉａ ｄｉｃｌｉｎａ）Δ１７デサチュラーゼ由来の３コピーの合成Δ１７デサチュラーゼ遺伝子（Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中での発現のためにコドン最適化された）の発現、
（８）ＦＢＡＩＮ：：ＥＬ１Ｓ：：ＰＥＸ２０、ＧＰＡＴ：：ＥＬ１Ｓ：：ＸＰＲ、およびＧＰＤＩＮ：：ＥＬ１Ｓ：：ＬＩＰ２キメラ遺伝子内における、モルティエラ・アルピナ（Ｍｏｒｔｉｅｒｅｌｌａ ａｌｐｉｎａ）高親和力エロンガーゼ由来の３コピーの合成高親和力$C_{18/20}$エロンガーゼ遺伝子（Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中での発現のためにコドン最適化された）の発現、
（９）ＴＥＦ：：ＥＬ２Ｓ：：ＸＰＲキメラ遺伝子内における、スラウストキトリウム・アウレウム（Ｔｈｒａｕｓｔｏｃｈｙｔｒｉｕｍ ａｕｒｅｕｍ）$C_{18/20}$エロンガーゼ由来の１コピーの合成$C_{18/20}$エロンガーゼ遺伝子（Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中での発現のためにコドン最適化された）の発現、
（１０）ＴＥＦ：：ｒＥＬＯ２Ｓ：：ＰＥＸ２０キメラ遺伝子内における、ドブネズミ（Ｒａｔｔｕｓ ｎｏｒｖｅｇｉｃｕｓ）ｒＥＬＯ遺伝子由来の２コピーの合成$C_{16/18}$エロンガーゼ遺伝子（Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中での発現のためにコドン最適化された）の発現、
（１１）ＹＡＴ１：：Δ４Ｓ：：Ｐｅｘ１６キメラ遺伝子内における、スラウストキトリウム・アウレウム（Ｔｈｒａｕｓｔｏｃｈｙｔｒｉｕｍ ａｕｒｅｕｍ）Δ４デサチュラーゼ遺伝子由来の１コピーの合成Δ４デサチュラーゼ遺伝子（Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中での発現のために最適化された）の発現
（１２）ＦＢＡＩＮ：：ＯｔＥ２Ｓ：：Ｏｃｔキメラ遺伝子内における、オストレオコッカス・タウリ（Ｏｓｔｒｅｏｃｏｃｃｕｓ ｔａｕｒｉ）$C_{20/22}$エロンガーゼ遺伝子由来の１コピーの合成$C_{20/22}$エロンガーゼ遺伝子（Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中での発現のためにコドン最適化された）の発現、
（１３）オロチジン－５’－リン酸脱炭酸酵素をコードする天然Ｙ．リポリティカ（ｌｉ

ｐｏｌｙｔｉｃａ）Ｕｒａ３遺伝子の中断、
（１４）イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼをコードする天然Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）Ｌｅｕ２遺伝子の中断、
（１５）アシル－ｃｏＡオキシダーゼをコードする天然Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）Ｐｏｘ３遺伝子の中断、
（１６）Δ１２デサチュラーゼをコードする天然Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）遺伝子の中断、
（１７）リパーゼ１をコードする天然Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）Ｌｉｐ１遺伝子の中断、および
（１８）アシル－ＣｏＡオキシダーゼをコードする天然Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）Ｐｏｘ２遺伝子の中断。

【０３４８】

本出願人らはこの特定のヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）組換え株において、５．６％のＤＨＡ（全脂肪酸に対するＣ２２脂肪酸の総累積％は約２４％）の生成を実証するが、宿主細胞中のＤＨＡ濃度は、ここでの本発明に従った追加的遺伝的修正を通じて劇的に増大できることが考察された。さらにここで述べる教示および結果に基づいて、当業者が、ω－６Δ６デサチュラーゼ／Δ６エロンガーゼ経路および／またはω－３Δ６デサチュラーゼ／Δ６エロンガーゼ経路および／またはω－６Δ９エロンガーゼ／Δ８デサチュラーゼ経路および／またはω－３Δ９エロンガーゼ／Δ８デサチュラーゼ経路を使用した、様々なω－３および／またはω－６ＰＵＦＡ合成のための生産プラットホームとして油性酵母を使用してもたらされる、実行可能性および商業的有用性を認識することが期待される。

【実施例】

【０３４９】

以下の実施例で本発明をさらに定義する。これらの実施例は、本発明の好ましい実施形態を示しながら、例示のみの目的で提供されるものとする。上の考察およびこれらの実施例から、当業者は本発明の必須特性を把握でき、その精神と範囲を逸脱することなく、本発明の様々な変更および修正を行って、それを様々な使用法および条件に適合できる。

【０３５０】

一般方法

実施例で使用する標準組換えＤＮＡおよび分子クローニング技術は、技術分野でよく知られており、１．）サムブルック（Ｓａｍｂｒｏｏｋ），Ｊ．、フリッチュ（Ｆｒｉｔｓｃｈ），Ｅ．Ｆ．およびマニアティス（Ｍａｎｉａｔｉｓ），Ｔ．著、「分子クローニング：実験室マニュアル（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ）」、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ：Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ（１９８９年）、（マニアティス（Ｍａｎｉａｔｉｓ））、２．）Ｔ．Ｊ．シルハビー（Ｓｉｌｈａｖｙ）、Ｍ．Ｌ．ベンナン（Ｂｅｎｎａｎ）、およびＬ．Ｗ．エンクイスト（Ｅｎｑｕｉｓｔ）著、「遺伝子融合実験（Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔｓ ｗｉｔｈ Ｇｅｎｅ Ｆｕｓｉｏｎｓ）」、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ：Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ（１９８４年）、および３．）オースベル（Ａｕｓｕｂｅｌ），Ｆ．Ｍ．ら著、「分子生物学現代プロトコル（Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ）」、Ｇｒｅｅｎｅ ＰｕｂｌｉｓｈｉｎｇおよびＷｉｌｅｙ－Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅによる出版（１９８７年）で述べられる。

【０３５１】

微生物培養の維持および生育に適した材料および方法は、技術分野でよく知られている。以下の実施例で使用するのに適した技術は、次で述べられる。フィリップス・ゲアハルト（Ｐｈｉｌｌｉｐｐ Ｇｅｒｈａｒｄｔ）、Ｒ．Ｇ．Ｅ．マレー（Ｍｕｒｒａｙ）、ラルフＮ．コスティロウ（Ｒａｌｐｈ Ｎ．Ｃｏｓｔｉｌｏｗ）、ユージーンＷ．ネスター（Ｅｕｇｅｎｅ Ｗ．Ｎｅｓｔｅｒ）、ウィリスＡ．ウッド（Ｗｉｌｌｉｓ Ａ．Ｗｏｏ

ｄ）、ノエルR．クリーグ（Ｎｏｅｌ　Ｒ．Ｋｒｉｅｇ）およびG．ブリッグス・フィリップス（Ｇ．Ｂｒｉｇｇｓ　Ｐｈｉｌｌｉｐｓ）編、「一般微生物学方法マニュアル（Ｍａｎｕａｌ　ｏｆ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｆｏｒ　Ｇｅｎｅｒａｌ　Ｂａｃｔｅｒｉｏｌｏｇｙ」、米国微生物学会、Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，Ｄ．Ｃ．（１９９４年）、またはトーマス（Ｔｈｏｍａｓ），Ｄ．ブロック（Ｂｒｏｃｋ）著、「バイオテクノロジー：工業的微生物学テキストブック（Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ａ　Ｔｅｘｔｂｏｏｋ　ｏｆ　Ｉｎｄｕｓｔｒｉａｌ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ）」第２版、Ｓｉｎａｕｅｒ　Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ：Ｓｕｎｄｅｒｌａｎｄ，ＭＡ（１９８９年）。微生物細胞の生育および維持のために使用される全ての試薬および材料は、特に断りのない限り、ウィスコンシン州ミルウォーキーのアルドリッチ・ケミカルズ（Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ（Ｍｉｌｗａｕｋｅｅ，ＷＩ））、ミシガン州デトロイトのディフコ・ラボラトリーズ（ＤＩＦＣＯ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（Ｄｅｔｒｏｉｔ，ＭＩ））、メリーランド州ゲーサーズバーグのギブコ／ＢＲＬ（ＧＩＢＣＯ／ＢＲＬ（Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ））、またはミズーリ州セントルイスのシグマケミカル（Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｍｐａｎｙ（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ））から得た。

【０３５２】

大腸菌（Ｅ．　ｃｏｌｉ）（ＸＬ１－Ｂｌｕｅ）コンピテント細胞は、カリフォルニア州サンディエゴのストラタジーン（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ　Ｃｏｍｐａｎｙ（Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ））から購入した。大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）株は、典型的にルリア・ベルターニ（Ｌｕｒｉａ　Ｂｅｒｔａｎｉ）（ＬＢ）プレート上で３７℃で生育させた。

【０３５３】

一般分子クローニングは、標準法に従って実施した（サムブルック（Ｓａｍｂｒｏｏｋ）ら、前出）。オリゴヌクレオチドは、テキサス州スプリングのシグマ－ジェノシス（Ｓｉｇｍａ－Ｇｅｎｏｓｙｓ（Ｓｐｒｉｎｇ，ＴＸ））によって合成された。特に断りのない限り、個々のＰＣＲ増幅反応は、以下を含んでなる５０μＬの全容積で実施した。ＰＣＲ緩衝液（１０ｍＭのＫＣｌ、１０ｍＭの$(NH_4)_2SO_4$、２０ｍＭトリス－ＨＣｌ（ｐＨ８．７５）、２ｍＭの$MgSO_4$、０．１％トリトンＸ－１００を含有する）、１００μｇ／ｍＬのＢＳＡ（最終濃度）、各２００μＭのデオキシリボヌクレオチド三リン酸、各１０ピコモルのプライマー、およびカリフォルニア州サンディエゴのストラタジーン（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ（Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ））からの１μＬのＰｆｕ　ＤＮＡポリメラーゼ。部位特異的変異誘発は、ストラタジーン（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）のクイックチェンジ（ＱｕｉｃｋＣｈａｎｇｅ）（商標）部位特異的変異誘発キットを使用して、製造業者の取扱説明書に従って実施した。ＰＣＲまたは部位特異的変異誘発がサブクローニンに伴う場合は、コンストラクトを配列決定して、配列にエラー導入されなかったことを確認した。ＰＣＲ生成物はウィスコンシン州マディソンのプロメガ（Ｐｒｏｍｅｇａ（Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ））からのｐＧＥＭ－Ｔ－イージーベクター中にクローンした。

【０３５４】

ＤＮＡ配列は、ベクターとインサート特異的プライマーとの組み合わせを使用して、染料ターミネーター技術（米国特許第５，３６６，８６０号明細書、ＥＰ第２７２，００７号明細書）を使用して、ＡＢＩ自動シーケンサー上で生成した。ミシガン州アンアーバーのジーン・コーズ社（Ｇｅｎｅ　Ｃｏｄｅｓ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ（Ａｎｎ　Ａｒｂｏｒ，ＭＩ））からのシーケンチャー（Ｓｅｑｕｅｎｃｈｅｒ）中で配列編集を実施した。全配列は、双方向で少なくとも２回のカバレッジを表す。遺伝的配列の比較は、ＤＮＡＳＴＡＲ（ＤＮＡ　ＳＴＡＲ　Ｉｎｃ．）からのＤＮＡＳＴＡＲソフトウェアを使用して達成された。代案としては、ジェネティックス・コンピュータ・グループ（Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　Ｃｏｍｐｕｔｅｒ　Ｇｒｏｕｐ　Ｉｎｃ．）から入手できるプログラムスイート（ウィスコンシン・パッケージ（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ　Ｐａｃｋａｇｅ）バージョン９．０、ウィスコンシン州マディソンのジェネティックス・コンピュータ・グループ（Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　Ｃｏｍｐｕｔｅｒ　Ｇｒｏｕｐ）（ＧＣＧ）（Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ））を

使用して、遺伝的配列の操作を達成した。ＧＣＧプログラム「パイルアップ（Ｐｉｌｅｕｐ）」をギャップ創生デフォルト値１２およびギャップ延長デフォルト値４で使用した。ＧＣＧ「ギャップ（Ｇａｐ）」または「ベストフィット（Ｂｅｓｔｆｉｔ）」プログラムをデフォルトギャップ創生ペナルティ５０およびデフォルトギャップ延長ペナルティ３で使用した。特に断りのない限り、あらゆるその他の場合においてＧＣＧプログラムのデフォルトパラメーターを使用した。

【０３５５】

ＢＬＡＳＴ（基礎的局在性配列検索ツール（Ｂａｓｉｃ Ｌｏｃａｌ Ａｌｉｇｎｍｅｎｔ Ｓｅａｒｃｈ Ｔｏｏｌ））アルトシュール（Ａｌｔｓｃｈｕｌ），Ｓ．Ｆ．ら著、「Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．」２１５：４０３～４１０頁（１９９３年）および「Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．」２５：３３８９－３４０２頁（１９９７年））を実施して、ＢＬＡＳＴ「ｎｒ」データベース（全ての非冗長ジェンバンクＣＤＳ翻訳、３次元構造ブルックヘブンタンパク質データバンク由来配列、スイスＰＲＯＴタンパク質配列データベース、ＥＭＢＬおよびＤＤＢＪデータベースを含んでなる）に含まれる配列に対する類似性を有する単離配列を同定した。配列を全ての読み枠で翻訳し、ＮＣＢＩによって提供されるＢＬＡＳＴＸアルゴリズム（ギッシュ（Ｇｉｓｈ），Ｗ．およびステーツ（Ｓｔａｔｅｓ），Ｄ．Ｊ．著、「Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ」 ３：２６６～２７２頁（１９９３年））を使用して、「ｎｒ」データベースに含まれる全ての公共的に入手できるタンパク質配列との類似性について比較した。

【０３５６】

クエリー配列がそれに対して最も高い類似性を有する配列を要約するＢＬＡＳＴ比較の結果を％同一性、％類似性、および期待値に従って報告する。「％同一性」は、２つのタンパク質間で同一のアミノ酸の百分率として定義される。「％類似性」は、２つのタンパク質間で同一のまたは保存されたアミノ酸の百分率として定義される。「期待値」は、この大きさのデータベース検索で期待される、絶対的に偶然の特定スコアでのマッチ数を明記して、マッチの統計学的有意さを推定する。

【０３５７】

略語の意味は以下の通り。「ｓｅｃ」は秒を意味し、「ｍｉｎ」は分を意味し、「ｈ」は時間を意味し、「ｄ」は日を意味し、「μＬ」はマイクロリットルを意味し、「ｍＬ」はミリリットルを意味し、「Ｌ」はリットルを意味し、「μＭ」はマイクロモル濃度を意味し、「ｍＭ」はミリモル濃度を意味し、「Ｍ」はモル濃度を意味し、「ｍｍｏｌ」はミリモルを意味し、「μｍｏｌｅ」はマイクロモルを意味し、「ｇ」はグラムを意味し、「μｇ」はマイクログラムを意味し、「ｎｇ」はナノグラムを意味し、「Ｕ」は単位を意味し、「ｂｐ」は塩基対を意味し、「ｋＢ」はキロベースを意味する。

【０３５８】

ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）の形質転換および培養

ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＴＣＣ＃２０３６２、＃７６９８２、および＃９０８１２株は、メリーランド州ロックビルの米国微生物系統保存機関から購入した。Ｙ．リポリティカ（Ｙ．ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）株は、ＹＰＤ寒天（１％酵母菌抽出物、２％バクトペプトン、２％グルコース、２％寒天）上において通常２８℃で生育させた。代案としては「ＳＤ」培地は、以下を含んでなる。硫酸アンモニウム添加、アミノ酸無添加、および２％グルコース添加０．６７％酵母窒素ベース。

【０３５９】

Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）の形質転換は、特に断りのない限りチェン（Ｃｈｅｎ），Ｄ．Ｃ．ら著、「Ａｐｐｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．」４８（２）：２３２～２３５頁（１９９７年）の方法に従って実施した。簡単に述べると、ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）をＹＰＤプレート上に画線培養し、３０℃でおよそ１８時間生育させた。いくつかの大型白金耳を満たす細胞をプレートからこすり取り、

平均分子量３３５０の２．２５ｍＬの５０％ＰＥＧ、ｐＨ６．０の０．１２５ｍＬの２Ｍ酢酸Ｌｉ、０．１２５ｍＬの２Ｍ　ＤＴＴ、および５０μｇの剪断サケ精子ＤＮＡを含有する１ｍＬの形質転換緩衝液に再懸濁した。次に約５００ｎｇの直線化プラスミドＤＮＡを１００μＬの再懸濁細胞内でインキュベートし、１５分間隔でボルテックス混合しながら３９℃に１時間保った。細胞を選択培地プレートに蒔いて、３０℃に２～３日間保った。

【０３６０】

形質転換体の選択のためには、一般にＳＤ培地または最少培地（「ＭＭ」）を使用した。ＭＭの組成は以下のとおり。ミシガン州デトロイトのディフコ・ラボラトリーズ（ＤＩＦＣＯ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（Ｄｅｔｒｏｉｔ，ＭＩ））からの硫酸アンモニウムまたはアミノ酸を含まない０．１７％酵母菌窒素ベース、２％グルコース、０．１％プロリン、ｐＨ６．１。適切ならばアデニン、ロイシン、リジンおよび／またはウラシルのサプリメントを最終濃度０．０１％に添加した（それによって２０ｇ／Ｌの寒天で調製される「ＭＭＡ」、「ＭＭＬｅ」、「ＭＭＬｙ」、および「ＭＭＵ」選択培地を生成した）。

【０３６１】

代案としては形質転換体は、次を含んでなる５－フルオロオロチン酸（「ＦＯＡ」、また５－フルオロウラシル－６－カルボン酸一水和物とも）選択培地上で選択された。ＤＩＦＣＯラボラトリーズ（ＤＩＦＣＯ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）からの硫酸アンモニウムまたはアミノ酸を含まない０．１７％酵母窒素ベース、２％グルコース、０．１％プロリン、７５ｍｇ／Ｌのウラシル、７５ｍｇ／Ｌのウリジン、カリフォルニア州オレンジのザイモリサーチ社（Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｃｏｒｐ．（Ｏｒａｎｇｅ，ＣＡ））からの９００ｍｇ／Ｌ　ＦＯＡおよび２０ｇ／Ｌの寒天。

【０３６２】

最後に、油生成条件を促進するためにデザインされた「二段階生育条件」のために、次のようにして高グルコース培地（「ＨＧＭ」）を調製した。１４ｇ／ＬのKH_2PO_4、４ｇ／ＬのK_2HPO_4、２ｇ／Ｌの$MgSO_4 \cdot 7H_2O$、８０ｇ／Ｌグルコース（ｐＨ６．５）。以下のプロトコルに従った「二段階生育条件」下で株を培養した。最初に、２５０ｒｐｍ／分間で４８時間振盪しながら３０℃の液体ＭＭ中で細胞を三連で生育させた。遠心分離によって細胞を収集し、液体上清を抽出した。ペレット化した細胞をＨＧＭに再懸濁し、３０℃において２５０ｒｐｍ／分間で振盪しながら７２時間または９６時間のどちらかで生育させた。細胞を遠心分離によって再度収集し、液体上清を抽出した。

【０３６３】

「変性二段階生育条件」のいくつかのために使用された変性培地は、以下から成る「ＳＤ＋ＡＡ」培地であった。アミノ酸無添加であるが、硫酸アンモニウム、２０ｇグルコース、および１×アミノ酸ミクス（２０ｍｇ／ｍＬ硫酸アデニン、２０ｍｇ／ｍＬウラシル、２０ｍｇ／ｍＬのＬ－トリプトファン、２０ｍｇ／ｍＬのＬ－ヒスチジン－ＨＣＬ、２０ｍｇ／ｍＬのＬ－アルギニン－ＨＣＬ、２０ｍｇ／ｍＬのＬ－メチオニン、３０ｍｇ／ｍＬのＬ－チロシン、３０ｍｇ／ｍＬのＬ－ロイシン、３０ｍｇ／ｍＬのＬ－イソロイシン、３０ｍｇ／ｍＬのＬ－リジン－ＨＣｌ、５０ｍｇ／ｍＬのＬ－フェニルアラニン、１００ｍｇ／ｍＬのＬ－グルタミン酸、１００ｍｇ／ｍＬのＬ－アスパラギン酸、１５０ｍｇ／ｍＬのＬ－バリン、２００ｍｇ／ｍＬのＬ－スレオニン、および４００ｍｇ／ｍＬのＬ－セリン）添加の６．７ｇ酵母窒素ベース。

【０３６４】

ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）の脂肪酸分析

脂肪酸分析のために、ブライ（Ｂｌｉｇｈ），Ｅ．Ｇ．およびダイヤー（Ｄｙｅｒ），Ｗ．Ｊ．著、Ｃａｎ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．３７：９１１～９１７頁（１９５９年）で述べられるように、細胞を遠心分離し収集して脂質を抽出した。ナトリウムメトキシドでの脂質抽出物のエステル交換反応によって、脂肪酸メチルエステルを調製し（ローガン（Ｒｏｕｇｈａｎ），Ｇ．およびニシダ（Ｎｉｓｈｉｄａ），Ｉ．著、Ａｒｃｈ　Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｂｉｏｐｈｙｓ．２７６（１）：３８～４６頁（１９９０年））

、引き続きヒューレットパッカード（Ｈｅｗｌｅｔｔ－Ｐａｃｋａｒｄ）からの３０ｍ×０．２５ｍｍ（内径）ＨＰ－ＩＮＮＯＷＡＸカラムを装着したヒューレットパッカード（Ｈｅｗｌｅｔｔ－Ｐａｃｋａｒｄ）６８９０　ＧＣで分析した。オーブン温度は３．５℃／分で、１７０℃（２５分間保持）から１８５℃であった。

【０３６５】

直接塩基エステル交換のために、ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）培養物（３ｍＬ）を収集し、蒸留水で１回洗浄し、スピードバック（Ｓｐｅｅｄ－Ｖａｃ）内で真空下において５～１０分乾燥させた。ナトリウムメトキシド（１００μＬの１％）をサンプルに添加して、次にサンプルをボルテックスし２０分間振盪した。３滴の１Ｍ　ＮａＣｌおよび４００μＬのヘキサンを添加した後、サンプルをボルテックスして遠心分離した。上層を除去して上述のようにＧＣで分析した。

【０３６６】

実施例１

ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）における高発現のためのプロモーター同定

各プロモーターと、レポーター遺伝子としてβ－グルクロニダーゼ（ＧＵＳ）をコードする大腸菌（Ｅ．Ｃｏｌｉ）遺伝子とを含んでなるコンストラクトを合成して、ＴＥＦ、ＧＰＤ、ＧＰＤＩＮ、ＧＰＭ、ＧＰＡＴ、ＦＢＡ、ＦＢＡＩＮ、およびＹＡＴ１プロモーターのプロモーター活性を調べる比較研究を実施した（ジェファーソン（Ｊｅｆｆｅｒｓｏｎ），Ｒ．Ａ．著、Ｎａｔｕｒｅ．１４（３４２）：８３７～８３８頁（１９８９年））。次に組織化学的および蛍光定量的アッセイによって（ジェファーソン（Ｊｅｆｆｅｒｓｏｎ），Ｒ．Ａ．著、「Ｐｌａｎｔ　Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．Ｒｅｐｏｒｔｅｒ」５：３８７～４０５頁（１９８７年））、および／またはｍＲＮＡ定量化のためのリアルタイムＰＣＲを使用して、ＧＵＳ活性を測定した。

【０３６７】

キメラプロモーター：：ＧＵＳ：：ＸＰＲ遺伝子を含んでなるプラスミドの構築

プラスミドｐＹ５－３０（図６Ａ、配列番号１５４）は、以下を含んだ。ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）自律複製配列（ＡＲＳ１８）、ＣｏｌＥ１プラスミド複製起点、大腸菌（Ｅ．Ｃｏｌｉ）中での選択のためのアンピシリン抵抗性遺伝子（Ａｍｐ^{R}）、ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）中での選択のためのヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）ＬＥＵ２遺伝子、およびキメラＴＥＦ：：ＧＵＳ：：ＸＰＲ遺伝子。このプラスミドをベースとして、ＴＥＦプロモーターがその他の多様な天然Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）プロモーターによって置換される、一連のプラスミドを作り出した。

【０３６８】

下の表１１に示すプライマー、およびテンプレートとしてのゲノムＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＤＮＡ、またはウィスコンシン州マディソンのプロメガ（Ｐｒｏｍｅｇａ（Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ））からのｐＧＥＭ－Ｔ－イージーベクター中にクローンされた適切なＤＮＡ領域を含有するゲノムＤＮＡ断片のどちらかを使用して、推定上のプロモーター領域をＰＣＲによって増幅した。

【０３６９】

【表２１】

表11

キメラプロモーター::GUS::XPR遺伝子を含んでなるプラスミドの構成

プロモーター	プライマー	遺伝子に対する位置	RE部位	プラスミド名
GPD	YL211,YL212（配列番号 225および 226）	-968bp～gpd遺伝子の「ATG」翻訳開始部位（配列番号210）	SalIおよびNcoI	pYZGDG
GPDIN	YL376,YL377（配列番号227および228）	-gpd遺伝子周辺の973bp～+201bp（それによって+49bp～+194bpに位置する146bpのイントロンを含む）（配列番号211）	PstI/NcoI（プロモーター）およびPstI/SalI（ベクター）	pDMW222
GPM	YL203,YL204（配列番号229および230）	-875bp～gpm遺伝子の「ATG」翻訳開始部位（配列番号212）	NcoIおよびSalI	pYZGMG
GPAT	GPAT-5-1, GPAT-5-2（配列番号231および232）	-1130bp～gpat遺伝子の「ATG」翻訳開始部位（配列番号216）	SalIおよびNcoI	pYGPAT-GUS
FBA	ODMW314, YL341（配列番号233および234）	fba遺伝子周辺の-1001bp～-1bp（配列番号213）	NcoIおよびSalI	pDMW212
FBAIN	ODMW320, ODMW341（配列番号235および236）	fba遺伝子周辺の-804bp～+169bp（それによって+62bp～+165bpに位置する102bpのイントロンを含む）（配列番号214）	NcoIおよびSalI	pDMW214
YAT1	27203-F, 27203-R（配列番号237および238）	yat1遺伝子周辺の-778bp～-1bp（配列番号217）	HindIIIおよびSalI、またNcoIおよびHindIII	pYAT-GUS

注記：「ATG」翻訳開始コドンの「A」ヌクレオチドを+1 と命名した

【０３７０】

一般方法で述べられるようにして、ＧＰＤ、ＧＰＤＩＮ、ＧＰＭ、ＦＢＡ、およびＦＢＡＩＮについて個々のＰＣＲ増幅反応を５０μＬの全容積で実施した。サーモサイクラー条件は、次のように設定した。９５℃で１分間、５６℃で３０秒間、および７２℃で１分間を３５サイクルと、それに続く７２℃で１０分間の最終延長。

【０３７１】

日本国滋賀県大津市５２０－２１９３のタカラバイオからのプレミクス２×ＰＣＲ溶液の１：１希釈を使用して、ＧＰＡＴプロモーターのためのＰＣＲ増幅を５０μＬの全容積で実施した。最終組成物は以下を含有した。２５ｍＭのＴＡＰＳ（ｐＨ９．３）、５０ｍＭのＫＣｌ、２ｍＭの$MgCl_2$、１ｍＭの２－メルカプトエタノール、各２００μＭのデオキシリボヌクレオチド三リン酸、各１０ピコモルのプライマー、５０ｎｇテンプレート、および１．２５Ｕのウィスコンシン州マディソンのタカラミラスバイオ（Ｔａｋａｒａ Ｍｉｒｕｓ Ｂｉｏ（Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ））からのタカラ（ＴａＫａＲａ）Ｅｘ Ｔａｑ（商標）ＤＮＡポリメラーゼ。サーモサイクラー条件は、次のように設定した。９４℃で２．５分間、５５℃で３０秒間、および７２℃で２．５分間を３０サイクルと、それに続く７２℃で６分間の最終延長。

【０３７２】

ＹＡＴ１プロモーターのＰＣＲ増幅を、ＧＰＡＴについて上述したのと比較できる組成物中で実施した。反応混合物を最初に９４℃で１５０秒間加熱した。増幅は次のように実施した。９４℃で３０秒間、５５℃で３０秒間、および７２℃で１分間を３０サイクルと、それに続く７２℃で７分間の最終延長。

【０３７３】

キアゲン（Ｑｉａｇｅｎ）ＰＣＲ精製キットを使用して各ＰＣＲ生成物を精製し、次に（標準条件を使用して上表に従って）制限酵素で消化して１％（ｗ／ｖ）アガロース中でのゲル電気泳動法に続いて消化生成物を精製した。次に消化したＰＣＲ生成物（ＹＡＴ１からのものを除く）を同様に消化したｐＹ５－３０ベクター中にライゲートした。次に各反応からのライゲートしたＤＮＡを使用して、大腸菌（Ｅ．Ｃｏｌｉ）Ｔｏｐ１０、大腸菌（Ｅ．Ｃｏｌｉ）ＤＨ１０Ｂまたは大腸菌（Ｅ．Ｃｏｌｉ）ＤＨ５αを個別に形質転換した。形質転換体をアンピシリン（１００μｇ／ｍＬ）含有ＬＢ寒天上で選択した。

【０３７４】

ＹＡＴ１は、ｐＹ５－３０中へのクローニングに先だって追加的操作を必要とした。具体的にはＹＡＴ１ＰＣＲ生成物をＨｉｎｄＩＩＩおよびＳａｌＩで消化すると約６００ｂｐの断片が得られ、ＮｃｏＩおよびＨｉｎｄＩＩＩで消化すると約２００ｂｐの断片が得られた。双方の生成物を単離し精製した。次にプラスミドｐＹＧＰＡＴ－ＧＵＳをＳａｌＩおよびＮｃｏＩで消化し、約９．５ｋＢの断片を単離して精製した。３個のＤＮＡ断片を共にライゲートしてｐＹＡＴ－ＧＵＳを作り出した。

【０３７５】

各形質転換反応からのプラスミドＤＮＡの分析は、予想されたプラスミドの存在を立証した。これらのプラスミドを次のように命名した。ｐＹＺＧＤＧ（ＧＰＤ：：ＧＵＳ：：ＸＰＲキメラ遺伝子を含んでなる）、ｐＤＭＷ２２２（ＧＰＤＩＮ：：ＧＵＳ：：ＸＰＲキメラ遺伝子を含んでなる）、ｐＹＺＧＭＧ（ＧＰＭ：：ＧＵＳ：：ＸＰＲキメラ遺伝子を含んでなる）、ｐＹＧＰＡＴ－ＧＵＳ（ＧＰＡＴ：：ＧＵＳ：：ＸＰＲキメラ遺伝子を含んでなる）、ｐＤＭＷ２１２（ＦＢＡ：：ＧＵＳ：：ＸＰＲキメラ遺伝子を含んでなる）、ｐＤＭＷ２１４（ＦＢＡＩＮ：：ＧＵＳ：：ＸＰＲキメラ遺伝子を含んでなる）、およびｐＹＡＴ－ＧＵＳ（ＹＡＴ１：：ＧＵＳ：：ＸＰＲキメラ遺伝子を含んでなる）。

【０３７６】

一般方法で述べられるようにして、上の各プラスミド、およびさらにプラスミドｐＹ５－３０（ＴＥＦ：：ＧＵＳ：：ＸＰＲキメラ遺伝子を含んでなる）をＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中に別々に形質転換した。Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）宿主はＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＴＣＣ＃７６９８２またはＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＴＣＣ＃２０３６２、Ｙ２０３４株（下記実施例１３、ω－６Δ６デサチュラーゼ／Δ６エロンガーゼ経路によって１０％のＡＲＡを生成できる）のいずれかであった。全ての形質転換された細胞をロイシンを欠く最小培地プレート上に播種し、３０℃に２～３日間保った。

【０３７７】

ＧＵＳ発現の組織化学的分析によるヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）プロモーターの比較分析

プラスミドｐＹ５－３０、ｐＹＺＧＤＧ、ｐＹＺＧＭＧ、ｐＤＭＷ２１２、およびｐＤＭＷ２１４を含有するヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＴＣＣ＃７６９８２株を単一コロニーから３ｍＬのＭＭ中で３０℃においてＯＤ$_{600}$約１．０に生育させた。次に１００μＬの細胞を遠心分離によって収集し、１００μＬの組織化学的染色緩衝液に再懸濁して、３０℃でインキュベートした。染色緩衝液は、５ｍｇの５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリルグルクロニド（Ｘ－Ｇｌｕｃ）を５０μＬのジメチルホルムアミドに溶解し、続けて５ｍＬの５０ｍＭ ＮａＰＯ$_4$、ｐＨ７．０を添加して調製した。組織化学的染色の結果（図６Ｂ）は、コンストラクトｐＹ５－３０中のＴＥＦプロモーター、コンストラクトｐＹＺＧＤＧ中のＧＰＤプロモーター、コンストラクトｐＹＺＧＭＧ中のＧＰＭプロモーター、コンストラクトｐＤＭＷ２１２中の

ＦＢＡプロモーター、そしてコンストラクトｐＤＭＷ２１４中のＦＢＡＩＮプロモーターが全て活性であることを示した。ＦＢＡおよびＦＢＡＩＮプロモーターの双方が、その他の全プロモーターよりもはるかに強力であるように見え、ＦＢＡＩＮプロモーターが最も強いプロモーター活性を有した。

【０３７８】

別の実験で、プラスミドｐＹ５－３０、ｐＹＧＰＡＴ－ＧＵＳ、ｐＹＡＴ－ＧＵＳ、およびｐＤＭＷ２１４を含有するＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）Ｙ２０３４株を単一コロニーから５ｍＬのＳＤ培地中で３０℃においてＯＤ$_{６００}$約８．０に２４時間生育させた。次に遠心分離によって１ｍＬの細胞を収集した。残る培養を遠心分離してＨＧＭで２回洗浄し、各５ｍＬのＨＧＭに再懸濁して、３０℃でさらに生育させた。２４時間および１２０時間後に、約０．２５ｍＬの各培養を遠心分離して細胞を収集した。細胞サンプルを１００μＬの組織化学的染色緩衝液（前出）個別に再懸濁した。カリフォルニア州コスタメサのＩＣＮバイオメディカルズ（ＩＣＮ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ（Ｃｏｓｔａ　Ｍｅｓａ，ＣＡ））からのザイモラーゼ（Ｚｙｍｏｌａｓｅ）２０Ｔ（５μＬの１ｍｇ／ｍＬ）をそれぞれに添加して、混合物を３０℃でインキュベートした。

【０３７９】

組織化学的染色の結果は、ＳＤ培地で２４時間生育させると、コンストラクトｐＹＧＰＡＴ－ＧＵＳ中のＧＰＡＴプロモーターが活性であり、またコンストラクトｐＹＡＴ－ＧＵＳ中のＹＡＴ１プロモーターも活性であることを示した（図６Ｃ、「ＳＤ培地中２４時間」）。比較すると、ＧＰＡＴプロモーターはＴＥＦプロモーターよりもはるかに強力であるように見え、ＦＢＡＩＮプロモーターと比べて活性減少を示した。同様に細胞をＳＤ培地で２４時間生育させると、ＹＡＴ１プロモーターはＴＥＦプロモーターよりも強力であるが、ＦＢＡＩＮプロモーターおよびＧＰＡＴプロモーターよりも顕著に弱いように見えた。しかしＨＧＭ中で２４時間生育させた細胞中では、ＹＡＴ１プロモーターはＧＰＡＴプロモーターよりも強力であり、ＦＢＡＩＮプロモーターと同程度であった（図６Ｃ、「ＨＧ培地中２４時間」）。これはＨＧＭ中で１２０時間後も同じであった（図６Ｃ、「ＨＧ培地中１２０時間」）。したがってＹＡＴ１プロモーターは、窒素制限によって油性生育条件を促進する培地であるＨＧＭ中で、誘導されるように見えた。

【０３８０】

ＧＵＳ発現の蛍光定量的アッセイによるヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）プロモーターの比較分析

ＧＵＳ活性もまた、対応する基質β－グルクロニドからの４－メチルウンベリフェロン（４－ＭＵ）生成の蛍光定量的測定によってアッセイした（ジェファーソン（Ｊｅｆｆｅｒｓｏｎ），Ｒ．Ａ．著、「Ｐｌａｎｔ　Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．Ｒｅｐｏｒｔｅｒ」５：３８７～４０５頁（１９８７年））。

【０３８１】

プラスミドｐＹ５－３０、ｐＹＺＧＤＧ、ｐＹＺＧＭＧ、ｐＤＭＷ２１２、およびｐＤＭＷ２１４を含有するヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＴＣＣ＃７６９８２株を単一コロニーから３ｍＬのＭＭ中で（上述のように）３０℃においてＯＤ$_{６００}$約１．０に生育させた。次に各３ｍＬの培養を５０ｍＬのＭＭを含有する５００ｍＬフラスコに入れて、振盪培養器内で３０℃で約２４時間生育させた。細胞を遠心分離によって収集し、プロメガ（Ｐｒｏｍｅｇａ）細胞溶解緩衝液に再懸濁して、カリフォルニア州ビスタのバイオ１０１（ＢＩＯ　１０１（Ｖｉｓｔａ，ＣＡ））からのバイオプルベライザー（Ｂｉｏｐｕｌｖｅｒｉｚｅｒ）システムを使用して溶解した。遠心分離後、上清を除去して氷上に保存した。

【０３８２】

同様にプラスミドｐＹ５－３０、ｐＹＡＴ－ＧＵＳ、ｐＹＧＰＡＴ－ＧＵＳ、およびｐＤＭＷ２１４コンストラクトをそれぞれ含有するＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）Ｙ２０３４株を単一コロニーから１０ｍＬのＳＤ培地中で３０℃においてＯＤ$_{６００}$約５．０に４８時間生育させた。下で述べられるように、各２ｍＬの培養をＧＵＳ活性ア

ッセイのために収集する一方、各５ｍＬの培養をＨＧＭに移した。

【０３８３】

具体的には、５ｍＬのアリコートからの細胞を遠心分離によって収集し、５ｍＬのＨＧＭで１回洗浄してＨＧＭ中に再懸濁した。次にＨＧＭ中の培養を振盪培養器中で３０℃において２４時間生育させた。ＧＵＳ活性アッセイのために各２ｍＬのＨＧＭ培養を収集し、残る培養をさらに９６時間生育させた後、さらに各２ｍＬの培養をアッセイのために収集した。

【０３８４】

ＳＤ培地中の各２ｍＬの培養サンプルをプロメガ（Ｐｒｏｍｅｇａ）からの１ｍＬの０．５×細胞培養溶解試薬に再懸濁した。再懸濁した細胞を２．０ｍＬのゴムＯリング付きネジ口試験管内で、０．６ｍＬのガラスビーズ（０．５ｍｍ直径）と混合した。次に細胞をオクラホマ州バートルズビルのバイオスペック（Ｂｉｏｓｐｅｃ（Ｂａｒｔｌｅｓｖｉｌｌｅ，ＯＫ））からのミニビーズビーター内で、最高設定で９０秒間均質化した。均質化混合物をエッペンドルフ遠心機内で１４，０００ｒｐｍで２分間遠心分離して、細胞残骸およびビーズを除去した。上清をＧＵＳアッセイおよびタンパク質測定のために使用した。

【０３８５】

各蛍光定量的アッセイでは、１００μＬの抽出物を７００μＬのＧＵＳアッセイ緩衝液（抽出緩衝液中２ｍＭの４－メチルウンベリフェリル－β－Ｄ－グルクロニド（「ＭＵＧ」））に添加し、または２００μＬの抽出物を８００μＬのＧＵＳアッセイ緩衝液に添加した。混合物を３７℃に置いた。１００μＬのアリコートを０、３０、および６０分間の時点で採取して、９００μＬの停止緩衝液（１ＭのNa_2CO_3）に入れた。励起波長３６０ｎｍおよび発光波長４５５ｎｍに設定した、マサチューセッツ州フレーミングハムのパーセプティブ・バイオシステムズ（ＰｅｒＳｅｐｔｉｖｅ Ｂｉｏｙｓｔｅｍｓ（Ｆｒａｍｉｎｇｈａｍ，ＭＡ））からのサイトフロー（ＣｙｔｏＦｌｕｏｒ）シリーズ４０００蛍光マルチウェルプレートリーダーを使用して、各時点を読み取った。１０μＬの抽出物および２００μＬのバイオラッド・ブラットフォード（ＢｉｏＲａｄ Ｂｒａｄｆｏｒｄ）試薬または２０μＬの抽出物および９８０μＬのバイオラッド・ブラットフォード（ＢｉｏＲａｄ Ｂｒａｄｆｏｒｄ）試薬を使用して、各サンプルの全タンパク質濃度を判定した（ブラットフォード（Ｂｒａｄｆｏｒｄ），Ｍ．Ｍ．著、Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．７２：２４８～２５４頁（１９７６年））。ＧＵＳ活性は、１分あたりのタンパク質１ｍｇあたりの４－ＭＵのナノモルとして表された。

【０３８６】

Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＴＣＣ＃７６９８２株Ｔ中で、ＴＥＦ、ＧＰＤ、ＧＰＭ、ＦＢＡ、およびＦＢＡＩＮプロモーターを比較するようにデザインされた、これらの蛍光定量的アッセイの結果を図７Ａに示す。具体的にはＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中で、ＦＢＡプロモーターはＧＰＤプロモーターよりも２．２倍強力であった。さらにＦＢＡＩＮプロモーターのＧＵＳ活性は、ＧＰＤプロモーターよりも約６．６倍強力であった。

【０３８７】

Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）Ｙ２０３４株中でＴＥＦ、ＧＰＡＴ、ＹＡＴ１、およびＦＢＡＩＮプロモーターを比較するようにデザインされたこれらの蛍光定量的アッセイの結果を下の表に示す。

【０３８８】

【表２２】

表12

様々な生育条件下でのTEF、FBAIN、YAT1、およびGPATプロモーター活性の比較

培養条件	プロモーター			
	TEF	FBAIN	YAT1	GPAT
48 時間 SD	0.401	43.333	0.536	5.252
24 時間 HGM	0.942	30.694	19.154	2.969
120 時間 HGM	0.466	17.200	13.400	3.050

【０３８９】
細胞抽出物のＧＵＳ活性に基づいてＹＡＴ１プロモーター活性が定量化された上のデータに基づいて、ＹＡＴ１プロモーター活性は、細胞をＳＤ培地からＨＧＭに移して２４時間生育させると約３７倍増大した。ＨＧＭ中で１２０時間後、活性はいくらか低下したが、なおもＳＤ培地中での活性よりも２５倍高かった。対照的にＦＢＡＩＮプロモーターおよびＧＰＡＴプロモーター活性は、ＳＤ培地からＨＧＭに移すと２４時間でそれぞれ３０％および４０％低下した。ＴＥＦプロモーター活性は、ＨＧＭ中で２４時間時間後に２．３倍増大した。したがってＹＡＴ１プロモーターは油性条件下で誘導可能である。
【０３９０】
ＧＵＳ発現の定量的なＰＣＲ分析によるヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）プロモーターの比較分析
定量的ＰＣＲ分析によってｐＹ５－３０、ｐＹＺＧＤＧ、ｐＤＭＷ２２２、ｐＤＭＷ２１２、およびｐＤＭＷ２１４コンストラクトを含有するＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中で、ＴＥＦ、ＧＰＤ、ＧＰＤＩＮ、ＦＢＡ、およびＦＢＡＩＮプロモーターの転写活性を判定した。これはＲＮＡの単離およびリアルタイムＲＴ－ＰＣＲを必要とした。
【０３９１】
より具体的にはｐＹ５－３０、ｐＹＺＧＤＧ、ｐＤＭＷ２２２、ｐＤＭＷ２１２、およびｐＤＭＷ２１４を含有するＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＴＣＣ＃７６９８２株を単一コロニーから２５ｍＬエルレンマイアーフラスコ内の６ｍＬのＭＭ中で３０℃において１６時間生育させた。次に各６ｍＬのスターター培養を１４０ｍＬのＨＧＭを含有する個々の５００ｍＬフラスコに入れて、３０℃で４日間インキュベートした。各２４時間のインターバルで、１ｍＬの各培養を各フラスコから除去して光学濃度を測定し、２７ｍＬを除去して（上述のように）蛍光定量的ＧＵＳアッセイのために使用し、１．５ｍＬの２つのアリコートをＲＮＡ単離のために除去した。ＲＮＡ単離のための培養を遠心分離して細胞ペレットを生成した。
【０３９２】
カリフォルニア州サンディエゴのキアゲン（Ｑｉａｇｅｎ（Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ））からの修正キアゲン（Ｑｉａｇｅｎ）ＲＮｅａｓｙミニプロトコルに従って、ＲＮＡをヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）株から単離した。簡単に述べると、各サンプルのための各時点で、３４０μＬのキアゲン（Ｑｉａｇｅｎ）の緩衝液ＲＬＴを使用して、２個の各細胞ペレットを再懸濁した。２本の各試験管からの緩衝液ＲＬＴ／細胞懸濁液混合物をカリフォルニア州サンディエゴのバイオ１０１（Ｂｉｏ１０１（Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ））からのビーズビーティング試験管内で合わせた。約５００μＬの０．５ｍＬガラスビーズを試験管に添加して、カリフォルニア州サンディエゴのバイオ１０１社（Ｂｉｏ１０１　Ｃｏｍｐａｎｙ（Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ））からのバイオプルベライザー（ＢｉｏＰｕｌｖｅｒｉｚｅｒ）中で設定５において２分間のビーズビーティングによって細胞を破壊した。次に１４，０００ｒｐｍで１分間の遠心分離によって破壊細胞をペレット

化して、３５０μＬの上清を新しい微小遠心管に移した。各均質化した溶解産物にエタノール（３５０μＬの７０％）を添加した。穏やかな混合後、全サンプルを２ｍＬ収集試験管内のＲＮｅａｓｙミニカラムに入れた。サンプルを１０，０００ｒｐｍで１５秒間遠心分離した。緩衝液ＲＷ１（３５０μＬ）をＲＮｅａｓｙミニカラムに添加して、カラムを１０，０００ｒｐｍで１５秒間遠心分離し細胞を洗浄した。溶出液は廃棄した。キアゲン（Ｑｉａｇｅｎ）のＤＮａｓｅ１原液（１０μＬ）を７０μＬの緩衝液ＲＤＤに添加して穏やかに混合した。この全ＤＮａｓｅ溶液をＲＮｅａｓｙミニカラムに入れて、室温で１５分間インキュベートした。インキュベーションステップ後、３５０μＬの緩衝液ＲＷ１をミニカラムに添加して、カラムを１０，０００ｒｐｍで１５秒間遠心分離した。カラムを７００μＬの緩衝液ＲＷ１で２回洗浄した。ＲＮＡ分解酵素フリーの水（５０μＬ）をカラムに添加した。カラムを１０，０００ｒｐｍで１分間遠心分離してＲＮＡを溶出した。

【０３９３】

全ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）ＲＮＡが最初にｃＤＮＡに転換され、次にリアルタイムＰＣＲを使用してｃＤＮＡが分析される、二段階ＲＴ－ＰＣＲプロトコルを使用した。カリフォルニア州フォスターシティのアプライド・バイオシステムズ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｔｅｍｓ（Ｆｏｓｔｅｒ Ｃｉｔｙ，ＣＡ））の高容量ｃＤＮＡアーカイブキット（製品番号４３２２１７１）およびフロリダ州ホリーヒルのメディアテック（Ｍｅｄｉａ Ｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．（Ｈｏｌｌｙ Ｈｉｌｌ、ＦＬ））からの分子生物学等級水（製品番号４６－０００－Ｃｏｎ）を使用して、ｃＤＮＡへの転換を実施した。ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）からの全ＲＮＡ（１００ｎｇ）を１０μＬのＲＴ緩衝液、４μＬの２５×ｄＮＴＰｓ、１０μＬの１０×ランダム六量体プライマー、５μＬのマルチスクライブ（Ｍｕｌｔｉｓｃｒｉｂｅ）逆転写酵素、および０．００５μＬのＲＮＡ分解酵素阻害物質と合わせて、水で全反応容積を１００μＬにして、それをｃＤＮＡに転換した。反応をサーモサイクラー内で２５℃で１０分間、続いて３７℃で２時間インキュベートした。リアルタイム分析に先だってｃＤＮＡを－２０℃で保存した。

【０３９４】

アプライド・バイオシステムズ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｔｅｍｓ）からのＳＹＢＲグリーンＰＣＲマスターミクス（製品番号４３０９１５５）を使用して、リアルタイム分析を実施した。逆転写反応（２μＬ）を１０μＬの２×ＳＹＢＲ ＰＣＲミクス、ＵＲＡ（すなわちプライマーＹＬ－ＵＲＡ－１６ＦおよびＹＬ－ＵＲＡ－７８Ｒ［配列番号２３９および２４０］）またはＧＵＳ（すなわちプライマーＧＵＳ－７６７ＦおよびＧＵＳ－８９１Ｒ［配列番号２４１および２４２］）のどちらかのための０．２μＬの１００μＭ順方向および逆方向プライマー、および７．２μＬの水に添加した。ＡＢＩ ７９００配列検出システム装置内で、反応を９５℃で１０分間、続いて９５℃で５秒間および６０℃で１分間を４０サイクルのサーモサイクルにかけた。各サイクル中の６０℃延長中に、リアルタイム蛍光データを収集した。

【０３９５】

１０／２００１更新のアプライド・バイオシステムズ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｔｅｍｓ）ユーザー公報＃２「遺伝子発現の相対定量化（Ｒｅｌａｔｉｖｅ Ｑｕａｎｔｉｔａｔｉｏｎ ｏｆ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ）」に従ってΔΔＣＴ法を使用し、相対定量化を実施した。ＵＲＡ遺伝子をＧＵＳ発現の正規化のために使用した。正規子遺伝子としてのＵＲＡの使用を確証するために、ＧＵＳおよびＵＲＡのＰＣＲ効率を比較したところ、それぞれ１．０４および０．９９であった（１．００が１００％効率と等しい）。ＰＣＲ効率はどちらも１００％近いので、ＧＵＳ発現のための正規子としてのＵＲＡの使用が確証され、発現定量化のためのΔΔＣＴ法の使用についても同様であった。正規化した量をΔＣＴと称する。

【０３９６】

異なる各株（すなわちｐＹＺＧＤＧ、ｐＤＭＷ２２２、ｐＤＭＷ２１２、およびｐＤＭＷ２１４コンストラクトを含有するＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＴＣＣ

＃７６９８２株）中のＧＵＳｍＲＮＡをｐＹ５－３０（ＴＥＦ：：ＧＵＳ）で、株のｍＲＮＡレベルに定量化した。したがって発現の相対定量化は、ＴＥＦ：：ＧＵＳを標準試料として株のｍＲＮＡレベルを使用して計算した。ＧＰＤ：：ＧＵＳ、ＧＰＤＩＮ：：ＧＵＳ、ＦＢＡ：：ＧＵＳ、およびＦＢＡＩＮ：：ＧＵＳの正規化した値をＴＥＦ：：ＧＵＳ標準の正規化した値と比較した。この量をΔΔＣＴと称する。次に式、$2^{-\Delta\Delta CT}$を使用して、ΔΔＣＴ値を絶対値に変換する。これらの値は、キメラＴＥＦ：：ＧＵＳ遺伝子と比べた、キメラＧＰＤ：：ＧＵＳ、ＧＰＤＩＮ：：ＧＵＳ、ＦＢＡ：：ＧＵＳ、およびＦＢＡＩＮ：：ＧＵＳ遺伝子を含んでなる株中のＧＵＳのｍＲＮＡレベルの増加倍数を指す。この方法を使用して、ＴＥＦプロモーターの活性をＧＰＤ、ＧＰＤＩＮ、ＦＢＡ、およびＦＢＡＩＮプロモーターと比較することが可能であった。

【０３９７】

各ＧＵＳキメラ遺伝子のｍＲＮＡの相対定量化の結果を図７Ｂに示す。より具体的には、アッセイは、ＨＧＭ中で２４時間後にＦＢＡおよびＦＢＡＩＮプロモーターの転写活性が、ＴＥＦプロモーターよりもそれぞれ約３．３および６倍強力であったことを示した。同様にＧＰＤおよびＧＰＤＩＮプロモーターの転写活性は、ＴＥＦプロモーターよりもそれぞれ約２および４．４倍強力であった。ＦＢＡ：：ＧＵＳ、ＦＢＡＩＮ：：ＧＵＳ、ＧＰＤ：：ＧＵＳ、およびＧＰＤＩＮ：：ＧＵＳ遺伝子融合の転写活性が４日間の実験期間中に低下したのに対し、ＦＢＡＩＮおよびＧＰＤＩＮプロモーターの転写活性は、実験最終日においてＴＥＦプロモーターよりもなおも約３および２．６倍強力であった。

【０３９８】

実施例２

ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）において遺伝子転写を増大するのに有用なエンハンサーの同定

ＦＢＡＩＮおよびＧＰＤＩＮの強力なプロモーター活性（活性がＦＢＡおよびＧＰＤプロモーター活性をそれぞれ超える）、および各プロモーター領域内のイントロンの同定に基づいて、本研究を実施して各イントロン中にエンハンサーが存在するかどうかを判定した。

【０３９９】

具体的には、ＧＰＭ：：ＦＢＡＩＮプロモーター融合物およびＧＰＭ：：ＧＰＤＩＮプロモーター融合物から成る２つのキメラプロモーターを生じさせ、ＧＵＳレポーター遺伝子の発現を進行させた。キメラプロモーター（「構成要素１」および「構成要素２」を含んでなる）については下の表１３で記述される。

【０４００】

【表２３】

表13

キメラプロモーター::GUS::XPR遺伝子中のキメラプロモーターを含んでなるプラスミドの構成

キメラプロモーター	構成要素１	構成要素２	プラスミド名
GPM::FBAIN（配列番号219）	GPMの-1bp～-843bp領域	FBAINの+1bp～+171bp領域、イントロンは+62bp～+165bpに位置する	pDMW224
GPM::GPDIN（配列番号220）	GPMの-1bp～-843bp領域	GPDINの+1bp～+198bp領域、イントロンは+49bp～+194bpに位置する	pDMW225

【０４０１】

キメラプロモーターは、それぞれがプラスミドｐＤＭＷ２２４およびｐＤＭＷ２２５中のＧＵＳレポーター遺伝子の発現を推進するように配置される。

【０４０２】

（実施例１で述べられるような）組織化学的アッセイからの結果に基づいて、ｐＹ５－

３０、ｐＹＺＧＤＧ、ｐＹＺＧＭＧ、およびｐＤＭＷ２１４コンストラクトを含んでなるＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）株中のＧＵＳ活性とｐＤＭＷ２２４およびｐＤＭＷ２２５を含んでなるＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）株のＧＵＳ活性とを比べることで、ＧＰＭ：：ＦＢＡＩＮプロモーターおよびＧＰＭ：：ＧＰＤＩＮプロモーターの活性をＴＥＦ、ＦＢＡＩＮ、ＧＰＤＩＮ、およびＧＰＭプロモーターと比較した。以前判定されたように、ＦＢＡＩＮプロモーターは最強のプロモーターであった。しかしキメラＧＰＭ：：ＦＢＡＩＮプロモーターおよびキメラＧＰＭ：：ＧＰＤＩＮプロモーターは、どちらもＧＰＭプロモーターよりもはるかに強力であり、ＧＰＤＩＮプロモーターと活性が同等であるように見えた。したがってこれはＧＰＤＩＮプロモーターおよびＦＢＡＩＮプロモーターの双方におけるエンハンサーの存在を立証した。

【０４０３】

当業者はＧＰＤＩＮイントロンまたはＦＢＡＩＮイントロンのどちらかを使用して、同様のキメラプロモーターを容易に構築できるであろう。

【０４０４】

実施例３

スルホニル尿素選択

るヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）の遺伝的改善は、適切な非抗生物質選択可能形質転換マーカーの欠如によって妨げられてきた。本実施例は、一般に、半数体、二倍体、異数体または異型接合性であってもよい工業酵母株にもまた適用できる、スルホニル尿素抵抗性に基づくＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）のための優勢な非抗生物質マーカーの開発について述べる。

【０４０５】

理論および初期感度スクリーニング

アセトヒドロキシ酸シンターゼ（ＡＨＡＳ）は、分枝鎖アミノ酸の生合成経路の最初の一般的な酵素である。これはスルホニル尿素およびイミダゾリノン除草剤の標的である。したがってスルホニル尿素除草剤抵抗性は、微生物および植物の双方において報告されている。例えばサッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）においては、ＡＨＡＳ中の単一のＷ５８６Ｌ突然変異がスルホニル尿素除草剤に対する抵抗性を与える（ファルコ（Ｆａｌｃｏ），Ｓ．Ｃ．、ら著、「Ｄｅｖ．Ｉｎｄ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．」３０：１８７～１９４頁（１９８９年）；ダグルビー（Ｄｕｇｇｌｅｂｙ），Ｒ．Ｇ．ら著、「Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．」２７０：２８９５頁（２００３年））。

【０４０６】

野性型ＡＨＡＳ Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）（ジェンバンク登録番号ＸＰ＿５０１２７７）およびＳ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）（ジェンバンク登録番号Ｐ０７３４２）酵素のアミノ酸配列を比較すると、Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）酵素の５８６位のＴｒｐアミノ酸残基は、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）酵素４９７位のＴｒｐ残基と同等であった。したがって野性型細胞それ自身がスルホニル尿素に感応性であれば、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）酵素中のＷ４９７Ｌ突然変異は、おそらくスルホニル尿素除草剤抵抗性を与えると仮定される。当業者によく知られている方法を使用して、スルホニル尿素（クロリムロンエチル）は最小培地中に１００μｇ／ｍＬの濃度で、野性型Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）株ＡＴＣＣ＃２０３６２およびＡＴＣＣ＃９０８１２の生育を阻害するのに十分であることが判定された。

【０４０７】

突然変異Ｗ４９７Ｌ ＡＨＡＳ遺伝子の合成

Ｗ４９７Ｌ突然変異（配列番号２４３）を含有するＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＨＡＳ遺伝子を二段階反応でゲノムＤＮＡから作り出した。最初にストラタジーン（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）からのＰｆｕウルトラ（商標）高忠実度ＤＮＡポリメラーゼ（カタログ番号６００３８０）およびプライマー４１０および４１１［配列番号２４４

および２４５］を使用して、ゲノムＤＮＡからＡＨＡＳ遺伝子の５’部分を増幅し、同様にプライマー４１２および４１３［配列番号２４６および２３７］を使用して遺伝子の３’部分を増幅した。２対のプライマーは、重複領域がＷ４９７Ｌ突然変異（「ＣＴ」が「ＴＧ」に変化する突然変異）を含むように重複した。

【０４０８】

正確なサイズの５’および３’ＰＣＲ生成物をゲル精製して第２回目のＰＣＲのためのテンプレートとして使用し、プライマー４１４および４１５（配列番号２４８および２４９）および２つの主要ＰＣＲ反応からの生成物の混合物を使用して、突然変異遺伝子全体を増幅した。この突然変異遺伝子は、それ自体の天然プロモーターおよびターミネーター配列を保有した。酵素ＳａｌＩ／ＢｓｉＷＩでの消化に続いて、正確なサイズの第２回目のＰＣＲ生成物をゲル精製し、インフュージョン（ｉｎ－ｆｕｓｉｏｎ）技術によってプラスミドｐＹ３５［キメラＴＥＦ：：フザリウム・モニリフォルメ（Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｍｏｎｉｌｉｆｏｒｍｅ）Δ１２デサチュラーゼ（Ｆｍ２）遺伝子、大腸菌（Ｅ．Ｃｏｌｉ）複製起点、細菌アンピシリン抵抗性遺伝子、ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）Ｌｅｕ２遺伝子、およびヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）自律複製配列（ＡＲＳ）を含有する、さらに詳しくは国際公開第２００５／０４７４８５号パンフレットを参照されたい］のベクター主鎖中にクローンした。インフュージョン（ｉｎ－ｆｕｓｉｏｎ）反応混合物をインヴィトロジェン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）からのＴＯＰ１０コンピテント（カタログ番号Ｃ４０４０－１０）細胞に形質転換した。ＬＢ／Ａｍｐプレート上で１日間の選択後、８個のコロニーをＤＮＡミニプレップによって分析した。制限酵素消化によって、７個のクローンが正しいことが立証された。スルホニル尿素抵抗性遺伝子ならびにＬＥＵ遺伝子を含有するそれらの１つを「ｐＹ５７」（または「ｐＹ５７．Ｙｌ．ＡＨＡＳ．ｗ４９７ｌ」、図３Ｂ）と命名した。

【０４０９】

標準酢酸リチウム法によって、ｐＹ５７および「空の」ＬＥＵで野性型Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）株ＡＴＣＣ＃９０８１２および＃２０３６２を形質転換した。「Ｎｏ－ＤＮＡ」を含んでなる形質転換調節もまた利用した。形質転換体をＭＭまたはＭＭ＋スルホニル尿素（ＳＵ、１００μｇ／ｍＬ）寒天プレートのどちらかの上に播種し、４日間の生育に続いてコロニーの存在または不在を評価した。

【０４１０】

【表２４】

表14

ヤロウィア・リポリティカにおけるAHAS選択

プラスミド	ATCC#90812		ATCC#20362	
	MM	MM+SU（100μg/mL）	MM	MM+SU（100μg/mL）
pY57	コロニー	コロニー	コロニー	コロニー
Leu ベクター対照	コロニー	コロニーなし	コロニー	コロニーなし
DNA 対照なし	コロニーなし	コロニーなし	コロニーなし	コロニーなし

【０４１１】

上に示す結果に基づいて、ＡＨＡＳ　Ｗ４９７ＬはＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＴＣＣ＃９０８１２および＃２０３６２の双方において、良好な非抗生物質選択マーカーであった。引き続いて本出願人らは、１５０μｇ／ｍＬのスルホニル尿素濃度を使用した。この新しいマーカーは外来性遺伝子に依存しないが突然変異天然遺伝子に依存し、栄養要求性を必要とせず、また栄養要求性ももたらさないため、Ｙ．リポリティカ

（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）を形質転換するのに有利である。除草剤はヒトおよび動物には無毒である。

【０４１２】

突然変異ＡＨＡＳ酵素がここで述べられるのと類似の様式で作り出される場合、この選択方法は、一般に、半数体、二倍体、異数体または異型接合性であってもよいその他の工業酵母株に適用できることが期待される。

【０４１３】

実施例４

ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）におけるコドン最適化Δ４デサチュラーゼ遺伝子の合成および機能的発現

国際公開第２００４／１０１７５３号パンフレットで述べられるのと同様にして、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中での発現のために、スラウストキトリウム・アウレウム（Ｔｈｒａｕｓｔｏｃｈｙｔｒｉｕｍ　ａｕｒｅｕｍ）（ジェンバンク登録番号ＡＡＮ７５７０７）のΔ４デサチュラーゼ遺伝子（ジェンバンク登録番号ＡＦ３９０１７４）のコドン使用頻度を最適化した。具体的にはヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）コドン使用頻度パターン、ＡＴＧ翻訳開始コドン周辺の共通配列、およびＲＮＡ安定性の一般法則（グハニヨギ（Ｇｕｈａｎｉｙｏｇｉ），Ｇ．およびＪ．ブルーアー（Ｂｒｅｗｅｒ）著、「Ｇｅｎｅ」　２６５（１～２）：１１～２３頁（２００１年））に従って、スラウストキトリウム・アウレウム（Ｔｈｒａｕｓｔｏｃｈｙｔｒｉｕｍ　ａｕｒｅｕｍ）遺伝子（配列番号１０４）のＤＮＡ配列に基づいて、コドン最適化Δ４デサチュラーゼ遺伝子（配列番号１０６および１０７））をデザインした。翻訳開始部位の修正に加えて１５４５ｂｐのコード領域の１７０ｂｐ（１１％）を修正し、１６６コドンを最適化した。翻訳開始部位を修正するために、配列番号１０５の第２のアミノ酸（Ｔ）（野性型）はコドン最適化Δ４デサチュラーゼ遺伝子（配列番号１０７）に含まれなかった。

【０４１４】

コドン最適化Δ４デサチュラーゼ遺伝子の生体外（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）合成

コドン最適化Δ４デサチュラーゼ遺伝子を次のようにして合成した。最初に１６対のオリゴヌクレオチドをデザインし、スラウストキトリウム・アウレウム（Ｔｈｒａｕｓｔｏｃｈｙｔｒｉｕｍ　ａｕｒｅｕｍ）Δ４デサチュラーゼ遺伝子のコドン最適化コード領域（例えばＤ４－１Ａ、Ｄ４－１Ｂ、Ｄ４－２Ａ、Ｄ４－２Ｂ、Ｄ４－３Ａ、Ｄ４－３Ｂ、Ｄ４－４Ａ、Ｄ４－４Ｂ、Ｄ４－５Ａ、Ｄ４－５Ｂ、Ｄ４－６Ａ、Ｄ４－６Ｂ、Ｄ４－７Ａ、Ｄ４－７Ｂ、Ｄ４－８Ａ、Ｄ４－８Ｂ、Ｄ４－９Ａ、Ｄ４－９Ｂ、Ｄ４－１０Ａ、Ｄ４－１０Ｂ、Ｄ４－１１Ａ、Ｄ４－１１Ｂ、Ｄ４－１２Ａ、Ｄ４－１２Ｂ、Ｄ４－１３Ａ、Ｄ４－１３Ｂ、Ｄ４－１４Ａ、Ｄ４－１４Ｂ、Ｄ４－１５Ａ、Ｄ４－１５Ｂ、Ｄ４－１６Ａ、およびＤ４－１６Ｂ、配列番号２５０～２８１に対応する）の全長を延長した。各５’－末端の４ｂｐのオーバーハングを除いて、センス（Ａ）およびアンチセンス（Ｂ）オリゴヌクレオチドの各対は相補的であった。さらに引き続くサブクローニングのために、プライマーＤ４－１Ｆ（配列番号２８２）をＮｃｏＩ部位に導入し、プライマーＤ４－４Ｒ（配列番号２８３）およびＤ４－５Ｆ（配列番号２８４）をＢａｍＨＩ部位に導入し、プライマーＤ４－８Ｒ（配列番号２８５）およびＤ４－９Ｆ（配列番号２８６）をＨｉｎｄＩＩＩ部位を導入してそれによって＃２７４アミノ酸をＰｈｅからＬｅｕに変化させ、プライマーＤ４－１２Ｒ（配列番号２８７）およびＤ４－１３（配列番号２８８）をＡｐａＬＩ部位に導入し、プライマーＤ４－１６Ｒ（配列番号２８９）をＮｏｔＩ部位を導入した。引き続いてプライマーＤ４－８ＲおよびＤ４－９Ｆによって導入された位置＃２７４でのアミノ酸変化を遺伝子全体のアセンブリーに続いて修正した。

【０４１５】

５０ｍＭのトリス－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）、１０ｍＭの$MgCl_2$、１０ｍＭのＤＴＴ、０．５ｍＭのスペルミジン、０．５ｍＭのＡＴＰ、および１０ＵのＴ４ポリヌクレオチドキナーゼを含有する２０μＬの容積で、各オリゴヌクレオチド（１００ｎｇ）を３７℃で１時間リン酸化した。以下のパラメーターを使用して、サーモサイクラー内でセンスお

よびアンチセンスオリゴヌクレオチドの各対を混合しアニールした。９５℃（２分間）、８５℃（２分間）、６５℃（１５分間）、３７℃（１５分間）、２４℃（１５分間）および４℃（１５分間）。このようにしてＤ４－１Ａ（配列番号２５０）をＤ４－１Ｂ（配列番号２５１）にアニールし、二本鎖生成物「Ｄ４－１ＡＢ」を生成した。同様にＤ４－２Ａ（配列番号２５２）をＤ４－２Ｂ（配列番号２５３）にアニールして、二本鎖生成物「Ｄ４－２ＡＢ」などを生成した。

【０４１６】

次に下に示すように、アニールされた二本鎖オリゴヌクレオチドの４つの別々のプールを共にライゲートした。プール１（Ｄ４－１ＡＢ、Ｄ４－２ＡＢ、Ｄ４－３ＡＢ、およびＤ４－４ＡＢを含んでなる）、プール２（Ｄ４－５ＡＢ、Ｄ４－６ＡＢ、Ｄ４－７ＡＢ、およびＤ４－８ＡＢを含んでなる）、プール３（Ｄ４－９ＡＢ、Ｄ４－１０ＡＢ、Ｄ４－１１ＡＢ、およびＤ４－１２ＡＢを含んでなる）、およびプール４（Ｄ４－１３ＡＢ、Ｄ４－１４ＡＢ、Ｄ４－１５ＡＢ、およびＤ４－１６ＡＢを含んでなる）。アニールされたオリゴヌクレオチドの各プールを２０μＬの容積で、１０ＵのＴ４ＤＮＡリガーゼと共に混合し、ライゲーション反応を１６℃で一晩インキュベートした。

【０４１７】

次に各ライゲーション反応の生成物をテンプレートとして使用し、デザインされたＤＮＡ断片をＰＣＲによって増幅した。具体的にはライゲートした「プール１」混合物（すなわちＤ４－１ＡＢ、Ｄ４－２ＡＢ、Ｄ４－３ＡＢ、およびＤ４－４ＡＢ）をテンプレートとして、オリゴヌクレオチドＤ４－１ＦおよびＤ４－４Ｒ（配列番号２８２および２８３）をプライマーとして使用し、コドン最適化Δ４デサチュラーゼ遺伝子の第１の部分をＰＣＲによって増幅した。一般方法で述べられるようにして、５０μＬの全容積でＰＣＲ増幅を実施した。増幅を次のようにして実施した。９５℃で３分間の初期変性、続いて９５℃で１分間、５６℃で３０秒間、７２℃で４０秒間を３５サイクル。７２℃で１０分間の最終延長サイクルを実施し、４℃での反応終結がそれに続いた。４３３ｂｐのＰＣＲ断片をプロメガプロメガ（Ｐｒｏｍｅｇａ）からのｐＧＥＭ－Ｔイージーベクター中にサブクローンして、ｐＴ４（１－４）を発生させた。

【０４１８】

ライゲートした「プール２」混合物（すなわちＤ４－５ＡＢ、Ｄ４－６ＡＢ、Ｄ４－７ＡＢ、およびＤ４－８ＡＢ）をテンプレートとして、オリゴヌクレオチドＤ４－５ＦおよびＤ４－８Ｒ（配列番号２８４および２８５）をプライマーとして使用して、コドン最適化Δ４デサチュラーゼ遺伝子の第２の部分を同様にＰＣＲによって増幅し、ｐＧＥＭ－Ｔ－イージーベクター中にクローンして、ｐＴ４（５－８）を発生させた。

【０４１９】

ライゲートした「プール３」混合物（すなわちＤ４－９ＡＢ、Ｄ４－１０ＡＢ、Ｄ４－１１ＡＢ、およびＤ４－１２ＡＢ）をテンプレートとして、オリゴヌクレオチドＤ４－９ＦおよびＤ４－１２Ｒ（配列番号２８６および２８７）をプライマーとして使用して、コドン最適化Δ４デサチュラーゼ遺伝子の第３の部分を同様にＰＣＲによって増幅し、ｐＧＥＭ－Ｔ－イージーベクター中にクローンして、ｐＴ４（９－１２）を発生させた。

【０４２０】

ライゲートした「プール４」混合物（Ｄ４－１３ＡＢ、Ｄ４－１４ＡＢ、Ｄ４－１５ＡＢ、およびＤ４－１６ＡＢ）をテンプレートとして、オリゴヌクレオチドＤ４－１３ＦおよびＤ４－１６Ｒ（配列番号２８８および２８９）をプライマーとして使用して、コドン最適化Δ４デサチュラーゼ遺伝子の第４の部分を同様にＰＣＲによって増幅し、ｐＧＥＭ－Ｔ－イージーベクター中にクローンして、ｐＴ４（１３－１６）を発生させた。

【０４２１】

大腸菌（Ｅ．Ｃｏｌｉ）をｐＴ４（１－４）、ｐＴ４（５－８）、ｐＴ４（９－１２）、およびｐＴ４（１３－１６）で別々に形質転換し、アンピシリン－抵抗性形質転換体からプラスミドＤＮＡを単離した。プラスミドＤＮＡを精製して適切な制限エンドヌクレアーゼで消化し、ｐＴ４（１－４）の４３３ｂｐのＮｃｏＩ／ＢａｍＨＩ断片、ｐ４（５－

８）の３８３ｂｐのＢａｍＨＩ／ＨｉｎｄＩＩＩ断片、ｐ４（９－１２）の４３６ｂｐのＨｉｎｄＩＩＩ／ＡｐａＬＩ断片、およびｐ４（１３－１６）の３８１ｂｐのＡｐａＬＩ／ＮｏｔＩ断片を遊離させた。次にこれらの４つの断片を合わせて、Ｎｃｏ１／Ｎｏｔ１消化ｐＺＵＦ１７（配列番号１６２、図９Ｂ）と共に一方向性にライゲートして、ｐＺＵＦ４（配列番号１６３）を生じさせた。

【０４２２】

ｐＺＵＦ４中の合成Δ４デサチュラーゼ遺伝子（「Ｄ４Ｓ」）の＃２７４のアミノ酸は、クローニング上の都合により最初にＰｈｅからＬｅｕに変化させた。ｐＺＵＦ４をテンプレートとして、オリゴヌクレオチドＹＬ２５１およびＹＬ２５２をプライマーとして（配列番号２９０および２９１）使用して、部位特異的変異誘発によって＃２７４アミノ酸のＬｅｕをＰｈｅに修正した。したがって得られたプラスミドはΔ４デサチュラーゼ遺伝子（配列番号１０６）の正確な合成アミノ酸配列を含有し、ｐＺＵＦ４Ｓと命名された（配列番号１６４、図９Ｃ）。

【０４２３】

Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）におけるコドン最適化Δ４デサチュラーゼ遺伝子の発現

一般方法で記述されるようにして、キメラＦＢＡＩＮ：：Ｄ４Ｓ：：Ｐｅｘ２０遺伝子を含んでなる自己複製プラスミドであるコンストラクトｐＺＵＦ４Ｓをヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）株Ｙ２０３６２Ｕ（ＦＯＡ抵抗性について選択することで生じさせたＡＴＣＣ＃２０３６２の自律的Ｕｒａ－突然変異体）に形質転換した。形質転換体細胞をＭＭ選択培地プレート上に播種して、３０℃に２～３日間保った。ＭＭプレート上に生育した形質転換体（３つ）を拾って、新鮮なＭＭプレート上に再度画線培養した。生育したらこれらの株を１０μｇのＤＰＡを添加した３ｍＬの液体ＭＭ中に個別に接種して、３０℃および２５０ｒｐｍ／分で２日間振盪した。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換によって脂肪酸メチルエステルを調製し、引き続いてヒューレットパッカード（Ｈｅｗｌｅｔｔ－Ｐａｃｋａｒｄ）６８９０　ＧＣで分析した。

【０４２４】

ＧＣ結果は、これらの３つの形質転換体中に約２％のＤＨＡが生成したことを示した。コドン最適化遺伝子の「％基質変換」は、約２０％と判定された。

【０４２５】

実施例５

ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）におけるコドン最適化$C_{20/22}$エロンガーゼ遺伝子の合成および機能性発現

国際公開第２００４／１０１７５３号パンフレットおよび実施例４（前出）で記述されるのと同様にして、オストレオコッカス・タウリ（Ｏｓｔｒｅｏｃｏｃｃｕｓ　ｔａｕｒｉ）の$C_{20/22}$エロンガーゼ遺伝子（ジェンバンク登録番号ＡＹ５９１３３６、「ＯｔＥｌｏ２」）のコドン使用頻度をＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）における発現のために最適化した。具体的には、ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）コドン使用頻度パターン（国際公開第２００４／１０１７５３号パンフレット）、「ＡＴＧ」翻訳開始コドン周辺の共通配列、およびＲＮＡ安定性の一般法則（グハニヨギ（Ｇｕｈａｎｉｙｏｇｉ），Ｇ．およびＪ．ブルーアー（Ｂｒｅｗｅｒ）著、「Ｇｅｎｅ」　２６５（１～２）：１１～２３頁（２００１年））に従って、オストレオコッカス・タウリ（Ｏｓｔｒｅｏｃｏｃｃｕｓ　ｔａｕｒｉ）（ジェンバンク登録番号ＡＹ５９１３３６、配列番号１００）の公開された配列に基づいて、コドン最適化ＯｔＥｌｏ２エロンガーゼ遺伝子（「ＯｔＥ２Ｓ」と命名される、配列番号１０２）をデザインした。翻訳開始部位の修正に加えて、９０３ｂｐのコード領域の１６０ｂｐを変性させ（１７．７％）、１４７個のコドンを最適化した（４９％）。コドン最適化ＯＲＦ（配列番号１０２および１０３）内の翻訳開始コドン周辺にＮｃｏＩ部位を付加するために、第２のアミノ酸が「Ｓ」から「Ａ」に変化させたこと以外は、コドン最適化遺伝子中のいずれの修正もタンパク質（配列番号１０

１）をコードするアミノ酸配列を変化させなかった。ニュージャージー州ピスカタウェイのジェンスクリプト社（ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ（Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ））によって、デザインされたＯｔＥ２Ｓ遺伝子が合成され、ｐＵＣ５７（ジェンバンク登録番号Ｙ１４８３７）中にクローンされてｐＯｔＥ２Ｓが生じた。

【０４２６】

Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）におけるコドン最適化ＯｔＥ２Ｓ遺伝子の発現

ｐＯｔＥ２ＳのＮｃｏＩ／ＮｏｔＩ断片を単離し、Ｎｃｏ１／Ｎｏｔ１消化ｐＺＵＦ１７（配列番号１６２、図９Ｂ）と共にライゲートしてｐＦＯＥ２Ｓ（図９Ｄ）を生じさせた。一般方法で記述されるようにして、キメラＦＢＡＩＮ：：ＯｔＥ２Ｓ：：Ｐｅｘ２０遺伝子を含んでなる自己複製プラスミドであるコンストラクトｐＦＯＥ２Ｓをヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）株Ｙ２０３６２Ｕ（ＦＯＡスクリーニング下で選択されたＡＴＣＣ＃２０３６２の自律的Ｕｒａ－突然変異体）に形質転換した。形質転換体細胞をＭＭ選択培地プレート上に播種して、３０℃に２～３日間保った。ＭＭプレート上に生育したｐＦＯＥ２ＳによるＹ２０３６２Ｕの形質転換体（３つ）を拾って、新鮮なＭＭプレート上に再度画線培養した。生育したらこれらの株を１０μｇのＥＰＡを添加した３ｍＬの液体ＭＭ中に個別に接種して、３０℃および２５０ｒｐｍ／分で２日間振盪した。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換によって脂肪酸メチルエステルを調製し、引き続いてヒューレットパッカード（Ｈｅｗｌｅｔｔ－Ｐａｃｋａｒｄ）６８９０　ＧＣで分析した。

【０４２７】

ＧＣ結果は、これら３つの形質転換体中に全脂質の約１％～１．３％のＤＰＡ、および約０．５％のＥＰＡがあったことを示した。これらの形質転換体におけるコドン最適化ＯｔＥ２Ｓ遺伝子のＥＰＡからＤＰＡへの「％基質変換」は、６７％と判定された。

【０４２８】

実施例６

ω－６Δ６デサチュラーゼ／Δ６エロンガーゼ経路：全脂質の５％を超えるＤＨＡを生成するＹ３０００株の創生

本実施例は、全脂質に対して５．６％のＤＨＡを生成できる、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＴＣＣ＃２０３６２由来Ｙ３０００株の構築について述べる（図５）。この株を改変して、ω－６Δ６デサチュラーゼ／Δ６エロンガーゼ経路を発現させた。

【０４２９】

Ｙ３０００株の開発は、Ｍ４株（８％のＤＧＬＡを生成する）、Ｙ２０４７株（１１％のＡＲＡを生成する）、Ｙ２０４８株（１１％のＥＰＡを生成する）、Ｙ２０６０株（１３％のＥＰＡを生成する）、Ｙ２０７２株（１５％のＥＰＡを生成する）、Ｙ２０７２Ｕ３株（１６％のＥＰＡを生成する）、Ｙ２０９８株（２２％のＥＰＡを生成する）、およびＹ２０９８Ｕ株（２１％のＥＰＡを生成する）の構築を必要とした。

【０４３０】

総脂質の約８％のＤＧＬＡを生成するＭ４株の構築

コンストラクトｐＫＵＮＦ１２Ｔ６Ｅ（図８Ａ、配列番号１５６）を生成して、野生型ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）ＡＴＣＣ＃２０３６２株のＵｒａ３遺伝子座に、４個のキメラ遺伝子（Δ１２デサチュラーゼ、Δ６デサチュラーゼ、および２つの$C_{18/20}$エロンガーゼを含んでなる）を組み込み、それによってＤＧＬＡの生成を可能にした。ｐＫＵＮＦ１２Ｔ６Ｅプラスミドは、以下の構成要素を含有した。

【０４３１】

【表２５】

表15

プラスミドpKUNF12T6E（配列番号156）の説明

配列番号156内のRE部位およびヌクレオチド	断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明
AscI/BsiWI（9420～8629）	ヤロウィアUra3遺伝子（ジェンバンク登録番号AJ306421）の784bpの5'部分
SphI/PacI（12128～1）	ヤロウィアUra3遺伝子（ジェンバンク登録番号AJ306421）の516bpの3'部分
SwaI/BsiWI（6380～8629）	以下を含んでなるFBAIN::EL1S::Pex20 ● FBAIN：FBAINプロモーター（配列番号214） ● EL1S：*モルティエラ・アルピナ*由来コドン最適化エロンガーゼ1遺伝子（配列番号24）（ジェンバンク登録番号AX464731） ● Pex20：ヤロウィアPex20遺伝子からのPex20ターミネーター配列（ジェンバンク登録番号AF054613）
BglII/SwaI（4221～6380）	以下を含んでなるTEF::Δ6S::Lip1 ● TEF：TEFプロモーター（ジェンバンク登録番号AF054508） ● Δ6S：*モルティエラ・アルピナ*由来コドン最適化Δ6デサチュラーゼ遺伝子（配列番号3）（ジェンバンク登録番号AF465281） ● Lip1：ヤロウィアLip1遺伝子からのLip1ターミネーター配列（ジェンバンク登録番号Z50020）
PmeI/ClaI（4207～1459）	以下を含んでなるFBA::F.Δ12::Lip2 ● FBA：FBAプロモーター（配列番号213） ● F.Δ12：フザリウム・モニリフォルメΔ12デサチュラーゼ遺伝子（配列番号32） ● Lip2：ヤロウィアLip2遺伝子からのLip2ターミネーター配列（ジェンバンク登録番号AJ012632）
ClaI/PacI（1459～1）	以下を含んでなるTEF::EL2S::XPR ● TEF：スラウストキトリウム・アウレウム由来TEFプロモーター（ジェンバンク登録番号AF054508） ● EL2S：コドン最適化エロンガーゼ遺伝子（配列番号27）、（米国特許第6,677,145号明細書） ● XPR：ヤロウィアXpr遺伝子（ジェンバンク登録番号M17741）の約100bpの3'領域

【０４３２】

ｐＫＵＮＦ１２Ｔ６ＥプラスミドをＡｓｃＩ／ＳｐｈＩで消化し、次に一般方法に従って使用して野生型Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＴＣＣ＃２０３６２を形質転換した。形質転換細胞をＦＯＡ選択培地プレート上に播種して、３０℃に２～３日間保った。ＦＯＡ抵抗性コロニーを拾って、ＭＭおよびＭＭＵ選択プレート上に画線培養した。ＭＭＵプレート上で生育できるが、ＭＭプレート上で生育できないコロニーをＵｒａ－株として選択した。次にＵｒａ－株の単一コロニーを３０℃の液体ＭＭＵ中に接種して、２５０ｒｐｍ／分で２日間振盪した。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換によって脂肪酸メチルエステルを調製し、引き続いてヒューレットパッカード（Ｈｅｗｌｅｔｔ－Ｐａｃｋａｒｄ）６８９０　ＧＣで分析した。

【０４３３】

ＧＣ分析は、ＤＧＬＡの存在をｐＫＵＮＦ１２Ｔ６Ｅの４個のキメラ遺伝子を含有する形質転換体中に示したが、野生型ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）対照株中には示さなかった。選択された３２Ｕｒａ－株のほとんどは、全脂質の約６％のＤＧＬＡを生成した。全脂質の約８％のＤＧＬＡを生成する２つの株（すなわち株Ｍ４および１３－８）があった。

【０４３４】

全脂質の約１０％のＡＲＡを生成するＹ２０４７株の創生

３つのΔ５キメラ遺伝子をヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）Ｍ４株のＬｅｕ２遺伝子中に組み込んで、コンストラクトｐＤＭＷ２７１（図８Ｂ、配列番号１５７）を生じさせた。プラスミドｐＤＭＷ２７１は、表１６で記述されるような以下の構成要素を含有した。

【０４３５】

【表２６】

表16

プラスミドpDMW271（配列番号157）の説明

配列番号157内のRE部位およびヌクレオチド	断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明
AscI/BsiWI（5520～6315）	ヤロウィアLeu2遺伝子（ジェンバンク登録番号AF260230）の788bpの5'部分
SphI/PacI（2820～2109）	ヤロウィアLeu2遺伝子（ジェンバンク登録番号AF260230）の703bpの3'部分
SwaI/BsiWI（8960～6315）	以下を含んでなるFBAIN::MAΔ5::Pex20 ● FBAIN：FBAINプロモーター（配列番号214） ● MAΔ5：*モルティエラ・アルピナ*Δ5デサチュラーゼ遺伝子（配列番号6）（ジェンバンク登録番号AF067654） ● Pex20：ヤロウィアのPex20遺伝子Pex20ターミネーター配列（ジェンバンク登録番号AF054613）
SwaI/ClaI（8960～11055）	以下を含んでなるTEF::MAΔ5::Lip1 ● TEF：TEFプロモーター（ジェンバンク登録番号AF054508） ● MAΔ5：配列番号6（前出） ● Lip1：ヤロウィアLip1遺伝子のLip1ターミネーター配列（ジェンバンク登録番号Z50020）
PmeI/ClaI（12690～11055）	ヤロウィアUra3遺伝子（ジェンバンク登録番号AJ306421）
ClaI/PacI（1～2109）	以下を含んでなるTEF::HΔ5S::Pex16 ● TEF：TEFプロモーター（ジェンバンク登録番号AF054508） ● HΔ5S：ヒト由来コドン最適化Δ5デサチュラーゼ遺伝子（配列番号13）（ジェンバンク登録番号NP_037534） ● Pex16：ヤロウィアPex16遺伝子のPex16ターミネーター配列（ジェンバンク登録番号U75433）

【０４３６】

プラスミドｐＤＭＷ２７１をＡｓｃＩ／ＳｐｈＩで消化し、次に一般方法に従って使用してＭ４株を形質転換した。形質転換に続いて細胞をＭＭＬｅプレート上に播種して、３０℃に２～３日間保った。ＭＭＬｅプレート上に生育した各形質転換からの個々のコロニーを拾って、ＭＭおよびＭＭＬｅプレート上に画線培養した。ＭＭＬｅプレート上で生育できるが、ＭＭプレート上で生育できないコロニーをＬｅｕ２－株として選択した。次に

Ｌｅｕ２－株の単一コロニーを３０℃の液体ＭＭＬｅ培地中に接種して、２５０ｒｐｍ／分で２日間振盪した。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換によって脂肪酸メチルエステルを調製し、引き続いてヒューレットパッカード（Ｈｅｗｌｅｔ－Ｐａｃｋａｒｄ）６８９０　ＧＣで分析した。

【０４３７】

ＧＣ分析はｐＤＭＷ２７１形質転換体中にＡＲＡの存在を示したが、親Ｍ４株には示さなかった。具体的には、４８個の選択されたｐＤＭＷ２７１によるＬｅｕ２－形質転換体中に、組換えヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）中の全脂質の５％未満のＡＲＡを生成した３５株、６～８％のＡＲＡを生成した１２株、および全脂質の約１１％のＡＲＡを生成した１株があった。１１％のＡＲＡを生成した株を「Ｙ２０４７」と命名した。

【０４３８】

全脂質の約１１％のＥＰＡを生成するＹ２０４８株の創生

３つの合成Δ１７デサチュラーゼキメラ遺伝子をＹ２０４７株のアシル－ＣｏＡオキシダーゼ３遺伝子に組み込んで、コンストラクトｐＺＰ３Ｌ３７（図８Ｃ、配列番号１５８）を作り出した。プラスミドｐＺＰ３Ｌ３７は、以下の構成要素を含有した。

【０４３９】

【表２７】

表17

プラスミドpZP3L37（配列番号158）の説明

配列番号158内のRE部位およびヌクレオチド	断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明
AscI/BsiWI（6813～6043）	ヤロウィアPox3遺伝子（ジェンバンク登録番号AJ001301）の763bpの5'部分
SphI/PacI（9521～10345）	ヤロウィアPox3遺伝子（ジェンバンク登録番号AJ001301）の818bpの3'部分
ClaI/BsiWI（4233～6043）	以下を含んでなるTEF::Δ17S::Pex20 ● TEF：TEFプロモーター（ジェンバンク登録番号AF054508） ● Δ17S：S.ディクリナ由来コドン最適化Δ17デサチュラーゼ遺伝子（配列番号21）（米国特許出願公開第2003/0196217 A1号明細書） ● Pex20：ヤロウィアPex20遺伝子のPex20ターミネーター配列（ジェンバンク登録番号AF054613）
ClaI/PmeI（4233～1811）	以下を含んでなるFBAIN::Δ17S::Lip2 ● FBAIN：FBAINプロモーター（配列番号214） ● Δ17S：配列番号21（前出） ● Lip2：ヤロウィアLip2遺伝子のLip2ターミネーター配列（ジェンバンク登録番号AJ012632）
PmeI/SwaI（1811～1）	ヤロウィアLeu2遺伝子（ジェンバンク登録番号AF260230）
PacI/SwaI（10345～1）	以下を含んでなるFBAINm::Δ17S::Pex16 ● FBAINm：FBAINmプロモーター（配列番号215） ● Δ17S：配列番号21（前出） ● Pex16：ヤロウィアPex16遺伝子のPex16ターミネーター配列（ジェンバンク登録番号U75433）

【０４４０】

プラスミドｐＺＰ３Ｌ３７をＡｓｃＩ／ＳｐｈＩで消化し、次に一般方法に従って使用してＹ２０４７株を形質転換した。形質転換に続いて細胞をＭＭプレート上に播種して、

３０℃に２～３日間保った。ＭＭプレート上に生育した全部で９６個の形質転換体を拾って、新鮮なＭＭプレート上に再度画線培養した。生育したらこれらの株を３０℃の液体ＭＭ中に個別に接種して、２５０ｒｐｍ／分で２日間振盪した。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換によって脂肪酸メチルエステルを調製し、引き続いてヒューレットパッカード（Ｈｅｗｌｅｔｔ－Ｐａｃｋａｒｄ）６８９０　ＧＣで分析した。

【０４４１】

ＧＣ分析はｐＺＰ３Ｌ３７による形質転換体のほとんどで、ＥＰＡの存在を示したが、親Ｙ２０４７株では示さなかった。９６個の選択されたｐＺＰ３Ｌ３７による形質転換体中に、組換えヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）中の全脂質の２％未満のＥＰＡを生成した２０株、２～３％のＥＰＡを生成した２３株、３～４％のＥＰＡを生成した５株、および約６％のＥＰＡを生成した２株（すなわち株＃７１および株＃９４）があった。一般方法で記述されるようにして、株＃７１（６％のＥＰＡを生成した）を「二段階生育条件」を使用して（すなわち４８時間のＭＭ、７２時間のＨＧＭ）、さらに分析した。ＧＣ分析は、株＃７１が全脂質の約１１％のＥＰＡを生成したことを示した。株を「Ｙ２０４８」と命名した。

【０４４２】

Ｕｒａ－表現型による全脂質の約１３％のＥＰＡを生成するＹ２０６０株の創生

Ｙ２０４８株中のＵｒａ３遺伝子を中断するために、コンストラクトｐＺＫＵＴ１６（図８Ｄ、配列番号１５９）を作り出して、ＴＥＦ：：ｒＥＬＯ２Ｓ：：Ｐｅｘ２０キメラ遺伝子をＹ２０４８株のＵｒａ３遺伝子に組み込んだ。ｒＥＬＯ２Ｓは、１６：０を１８：０に延長するラット肝酵素（すなわち$C_{16/18}$エロンガーゼ）ををコードするコドン最適化ｒＥＬＯ遺伝子である。プラスミドｐＺＫＵＴ１６は、以下の構成要素を含有した。

【０４４３】

【表２８】

表18

プラスミドpZKUT16（配列番号159）の説明

配列番号159内のRE部位およびヌクレオチド	断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明
BsiWI/PacI（1～721）	ヤロウィアUra3遺伝子（ジェンバンク登録番号AJ306421）の721bpの5'部分
SalI/ClaI（3565～4289）	ヤロウィアUra3遺伝子（ジェンバンク登録番号AJ306421）の724bpの3'部分
ClaI/BsiWI（4289～1）	以下を含んでなるTEF::rELO2S::Pex20 ● TEF:TEFプロモーター（ジェンバンク登録番号AF054508） ● rELO2S:ラット由来コドン最適化rELO2エロンガーゼ遺伝子（配列番号85）（ジェンバンク登録番号AB071986） ● Pex20:ヤロウィアPex20遺伝子のPex20ターミネーター配列（ジェンバンク登録番号AF054613）

【０４４４】

具体的にはプラスミドｐＺＫＵＴ１６をＳａｌＩ／ＰａｃＩで消化し、次に一般方法に従って使用してＹ２０４８株を形質転換した。形質転換に続いて細胞をＭＭ＋５－ＦＯＡ選択プレート上に播種し、３０℃に２～３日間保った。

【０４４５】

ＭＭ＋５－ＦＯＡプレート上に生育した全部で４０個の形質転換体を拾って、ＭＭプレ

ートおよびＭＭ＋５－ＦＯＡプレート上に別々に再度画線培養した。ＭＭ＋５－ＦＯＡプレート上で生育できるが、ＭＭプレート上では生育できない株をＵｒａ－株として選択した。これらの４０個の各Ｕｒａ－株を液体ＭＭＵ中に個別に接種して、３０℃および２５０ｒｐｍ／分で２日間振盪して生育させた。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換によって脂肪酸メチルエステルを調製し、引き続いてヒューレットパッカード（Ｈｅｗｌｅｔｔ－Ｐａｃｋａｒｄ）６８９０　ＧＣで分析した。

【０４４６】

ＧＣ分析は、ＭＭＵ培地中での２日間の生育後に、全脂質の５％未満のＥＰＡを生成した１４株、５～５．９％のＥＰＡを生成した９株、６～６．９％のＥＰＡを生成した１５株、および７～８％のＥＰＡを生成した７株があったことを示した。一般方法で記述されるようにして、７～８％のＥＰＡを生成した株を二段階生育条件（すなわち４８時間のＭＭ、９６時間のＨＧＭ）を使用してさらに分析した。ＧＣ分析は、これらの全ての株が１０％を超えるＥＰＡを生成したことを示し、その１つは全脂質の約１３％のＥＰＡを生成した。その株を「Ｙ２０６０」株と命名した。

【０４４７】

全脂質の約１５％のＥＰＡを生成するＹ２０７２株の創生

コンストラクトｐＫＯ２ＵＭ２５Ｅ（図８Ｅ、配列番号１６０）を作り出して、３つのキメラ遺伝子（$C_{18/20}$エロンガーゼ、Δ１２デサチュラーゼ、およびΔ５デサチュラーゼを含んでなる）のクラスターおよびＵｒａ３遺伝子をＹ２０６０株の天然ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）Δ１２デサチュラーゼ遺伝子部位に組み込んだ。プラスミドｐＫＯ２ＵＭ２５Ｅは以下の構成要素を含有した。

【０４４８】

【表２９】

表19

プラスミドpKO2UM25E（配列番号160）の説明

配列番号160内のRE部位およびヌクレオチド	断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明
HindIII/AscI（1～728）	ヤロウィアΔ12デサチュラーゼ遺伝子（配列番号28）の728bpの5'部分
SphI/EcoRI（3436～3992）	ヤロウィアΔ12デサチュラーゼ遺伝子（配列番号28）の556bpの3'部分
BsiWI/HindIII（10437～1）	以下を含んでなるGPAT::EL1S::XPR ● GPAT：GPATプロモーター（配列番号216） ● EL1S：*モルティエラ・アルピナ*由来コドン最適化エロンガーゼ1遺伝子（配列番号24）（ジェンバンク登録番号AX464731） ● XPR：ヤロウィアXpr遺伝子（ジェンバンク登録番号M17741）の約100bpの3'領域
BglII/BsiWI（7920～10437）	以下を含んでなるFBAIN::M.Δ12::Pex20 ● FBAIN：FBAINプロモーター（配列番号214） ● M.Δ12：モルティエラ・イザベリナΔ12デサチュラーゼ遺伝子（ジェンバンク登録番号AF417245；配列番号30） ● Pex20：ヤロウィアPex20遺伝子のPex20ターミネーター配列（ジェンバンク登録番号AF054613）
SalI/PacI（6046～7544）	ヤロウィアUra3遺伝子（ジェンバンク登録番号AJ306421）
EcoRI/SalI（3992～6046）	以下を含んでなるTEF::I.Δ5S::Pex20 ● TEF：TEFプロモーター（ジェンバンク登録番号AF054508） ● I.Δ5S：イソクリシス・ガルバナ由来コドン最適化Δ5デサチュラーゼ遺伝子（配列番号10）（国際公開第2002/081668号パンフレット） ● Pex20：ヤロウィアPex20遺伝子のPex20ターミネーター配列（ジェンバンク登録番号AF054613）

【０４４９】

具体的には、プラスミドｐＫＯ２ＵＭ２５ＥをＳｐｈＩ／ＡｓｃＩで消化し、次に一般方法に従って使用してＹ２０６０を形質転換した。形質転換に続いて細胞をＭＭプレート上に播種して、３０℃に２～３日間保った。

【０４５０】

ＭＭプレート上に生育した全部で６３個の形質転換体を拾って、新鮮なＭＭプレート上に再度画線培養した。生育したらこれらの株を３０℃の液体ＭＭ中に個別に接種し、２５０ｒｐｍ／分で２日間振盪して培養した。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換によって脂肪酸メチルエステルを調製し、引き続いてヒューレットパッカード（Ｈｅｗｌｅｔｔ－Ｐａｃｋａｒｄ）６８９０　ＧＣで分析した。

【０４５１】

ＧＣ分析は、ＭＭ培地中での１日間の生育後に、ほとんど全てのｐＫＯ２ＵＭ２５Ｅによる形質転換体中にＥＰＡの存在を示した。６３個の選択された形質転換体中に、６～８．９％のＥＰＡを生成した２６株、および９％を超えるＥＰＡを生成した４６株があった。９％を超えるＥＰＡを生成した株を一般方法で記述されるようにして二段階生育条件（

すなわち４８時間のＭＭ、９６時間のＨＧＭ）を使用して、さらなる分析のために選択した。ＧＣ分析は、二段階生育後、選択された４６株の内４５株が１１～１４．５％のＥＰＡを生成する一方、培養＃２は全脂質１５．１％のＥＰＡを生成したことを示した。この株（すなわち＃２）を「Ｙ２０７２」株と命名した。

【０４５２】

Ｕｒａ－表現型による全脂質の約１５－１６％のＥＰＡを生成するＹ２０７２Ｕ３およびＹ２０７２Ｕ４株の創生

コンストラクトｐＺＫＵＴ１６（図８Ｄ、配列番号１５９；前出）を使用して、ＴＥＦ：：ｒＥＬＯ２Ｓ：：Ｐｅｘ２０キメラ遺伝子をＹ２０７２株のＵｒａ３遺伝子に組み込んだ。具体的には一般方法に従って、ＳａｌＩ／ＰａｃＩ－消化プラスミドｐＺＫＵＴ１６を使用してＹ２０７２株を形質転換した。形質転換に続いて、細胞をＭＭ＋５－ＦＯＡ選択プレート上に播種し、３０℃に３～４日間保った。

【０４５３】

ＭＭ＋５－ＦＯＡプレート上に生育した全部で２４個の形質転換体を拾ってＭＭプレートおよびＭＭ＋５－ＦＯＡプレート上に別々に再度画線培養した。ＭＭ＋５－ＦＯＡプレート上で生育できるが、ＭＭプレート上では生育できない株をＵｒａ－株として選択した。これらの２４個のＵｒａ－株を液体ＭＭＵ中に個別に接種して、３０°Ｃおよび２５０ｒｐｍ／分で２日間振盪して培養した。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換によって脂肪酸メチルエステルを調製し、引き続いてヒューレットパッカード（Ｈｅｗｌｅｔｔ－Ｐａｃｋａｒｄ）６８９０　ＧＣで分析した。

【０４５４】

ＧＣ分析は、ＭＭＵ培地中での２日間の生育後に、全脂質の８．９％未満のＥＰＡを生成した１４株、９～９．９％のＥＰＡを生成した８株、および１０．１％のＥＰＡを生成した１株（すなわち＃１２）があったことを示した。株＃１２（１０．１％のＥＰＡ）および＃１１（９．６％のＥＰＡ）を二段階生育手順（すなわち４８時間のＭＭ、９６時間のＨＧＭ）を使用してさらに分析した。ＧＣ分析は株＃１２が約１５％のＥＰＡを生成したことを示し、この株を「Ｙ２０７２Ｕ３」株と命名した。対照的に株＃１１は約１６％のＥＰＡを生成し、この株を「Ｙ２０７２Ｕ４」株と命名した。

【０４５５】

全脂質の２３～２８％のＥＰＡを生成するＹ２０９６、Ｙ２０９７、Ｙ２０９８、Ｙ２１０５、およびＹ２１０６株の創生

コンストラクトｐＤＭＷ３０３（図９Ａ、配列番号１６１）を作り出して、４個のキメラ遺伝子クラスター（$C_{18/20}$エロンガーゼ、Δ６デサチュラーゼ、Δ５デサチュラーゼ、およびΔ１２デサチュラーゼを含んでなる）、およびＵｒａ３遺伝子を株Ｙ２０７２Ｕ３のヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）リパーゼ１遺伝子部位に組み込んだ。プラスミドｐＤＭＷ３０３は、以下の構成要素を含有した。

【０４５６】

【表３０】

表20

プラスミドpDMW303（配列番号161）の説明

配列番号161内のRE部位およびヌクレオチド	断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明
BsiWI/AscI（1～819）	ヤロウィアリパーゼ1遺伝子（ジェンバンク登録番号Z50020）の819bpの5'部分
SphI/PacI（35278～4297）	ヤロウィアリパーゼ1遺伝子（ジェンバンク登録番号Z50020）の769bpの3'部分
SwaI/BsiWI（13300～1）	以下を含んでなるGPAT::HΔ5S::Pex20 ● GPAT：GPATプロモーター（配列番号216） ● HΔ5S：ヒト由来コドン最適化Δ5デサチュラーゼ遺伝子（配列番号13）（ジェンバンク登録番号NP_037534） ● Pex20：ヤロウィアPex20遺伝子のPex20ターミネーター配列（ジェンバンク登録番号AF054613）
BglII/SwaI（10602～13300）	以下を含んでなるFBAIN::D6S::Lip1 ● FBAIN：FBAINプロモーター（配列番号214） ● Δ6S：*モルティエラ・アルピナ*由来コドン最適化Δ6デサチュラーゼ遺伝子（配列番号3）（ジェンバンク登録番号AF465281） ● Lip1：ヤロウィアLip1遺伝子からのLip1ターミネーター配列（ジェンバンク登録番号Z50020）
ClaI/PmeI（8081～10558）	以下を含んでなるGPDIN::EL1S::Lip2 ● GPDIN：GPDINプロモーター（配列番号211） ● EL1S：*モルティエラ・アルピナ*由来コドン最適化エロンガーゼ1遺伝子（配列番号24）（ジェンバンク登録番号AX464731） ● Lip2：ヤロウィアリパーゼ2遺伝子のLip2ターミネーター（ジェンバンク登録番号AJ012632）
EcoRI/ClaI（6453～8081）	ヤロウィアUra3遺伝子（ジェンバンク登録番号AJ306421）
PacI/EcoRI（4297～6453）	以下を含んでなるTEF::F.Δ12::Pex16 ● TEF：TEFプロモーター（ジェンバンク登録番号AF054508） ● F.Δ12：フザリウム・モニリフォルメΔ12デサチュラーゼ遺伝子（配列番号32） ● Pex16：ヤロウィアPex16遺伝子のPex16ターミネーター（ジェンバンク登録番号U75433）

【０４５７】

具体的には一般方法に従って、ＳｐｈＩ／ＡｓｃＩ－消化プラスミドをＹ２０７２Ｕ３株に形質転換した。形質転換に続いて細胞をＭＭプレート上に播種して、３０℃に３～４日間保った。

【０４５８】

ＭＭプレート上に生育した全部で４８個の形質転換体を拾って、新鮮なＭＭプレート上に再度画線培養した。生育したらこれらの株を３０℃での液体ＭＭ中に個別に接種して、２５０ｒｐｍ／分で振盪しながら２日間生育させた。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換によって脂肪酸メチルエステルを調製し、引き続いてヒューレットパッカード（Ｈｅｗｌｅｔｔ－Ｐａｃｋａｒｄ）６８９０　ＧＣで分析した。

【０４５９】
ＧＣ分析は、ＭＭ中での２日間の生育後に、ｐＤＭＷ３０３によるＹ２０７２Ｕ３の形質転換体のほとんど全てでＥＰＡが生成されたことを示した。４８個の選択された形質転換体中に、全脂質の１３．９％未満のＥＰＡを生成した３５株、１４～１６．９％のＥＰＡを生成した８株、および１７～１８．３％のＥＰＡを生成した４株があった。
【０４６０】
二段階生育手順（すなわち４８時間のＭＭ、９６時間のＨＧＭ）を使用したさらなる分析のために、全脂質の１４％を超えるＥＰＡを生成する株（すなわちＭＭ中で２日間後に）を選択した。ＧＣ分析は、全１２株で全脂質の１８％を超えるＥＰＡが生成したことを示した。それらの中で、株＃６（「Ｙ２０９６」株と命名された）は約２４％のＥＰＡを生成し、株＃４３（「Ｙ２０９７」株と命名された）は約２２．３％のＥＰＡを生成し、株＃４５（「Ｙ２０９８」株と命名された）は約２２．４％のＥＰＡを生成し、株＃４７（「Ｙ２０９９」株と命名された）は約２２．６％のＥＰＡを生成し、株＃５（「Ｙ２１０５」株と命名された）は約２３．３％のＥＰＡを生成し、株＃４８（「Ｙ２１０６」株と命名された）は全脂質の約２３％のＥＰＡを生成した。
【０４６１】
Ｙ２０９６株中のＥＰＡ含有量および油量を次のような修正二段階生育手順を使用してさらに分析した。２５０ｒｐｍ／分で振盪しながら３０℃の３ｍＬ　ＳＤ＋ＡＡ培地中で、単一コロニーからＹ２０９６株を生育させた。２４時間の生育後、３２ｍＬのＳＤ＋ＡＡ培地を含有するエルレンマイアーフラスコに、３ｍＬのスタータカルチャーを添加した。３０℃および２５０ｒｐｍ／分の振盪でさらに４８時間生育させた後、細胞をペレット化して、上清を除去した。ペレットを２５０ｍＬフラスコ内の３５ｍＬのＨＧＭ中に再懸濁した。３５ｍＬの培養物を３０℃でインキュベートし、２５０ｒｐｍ／分で振盪しながらさらに４日間生育させた。培養物のアリコート（１ｍＬ）をＧＣ分析のために使用し、３０ｍＬの培養を乾燥細胞重量の測定のために使用した。エステル交換のため、（内部標準として使用するため）４０μｇのＣ１５：０をナトリウムメトキシドに添加したこと以外は、一般方法で記述されるようにしてＧＣ分析を実施した。３０ｍＬの培養物からのH_2O洗浄細胞ペレットを凍結乾燥して、乾燥細胞重量を判定した。
【０４６２】
ＧＣ分析は、Ｙ２０９６が約２０．８％の油／乾燥細胞重量で、全脂質の約２８．１％のＥＰＡを生成したことを示した。Ｙ２０９６株は、野生型ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＴＣＣ＃２０３６２に対して、次の遺伝子型を有する。ＰＯＸ３－、ＬＩＰ１－、Ｙ．Δ１２－、ＦＢＡ：：Ｆ．Δ１２：：Ｌｉｐ２、ＴＥＦ：：Ｆ．Δ１２：：Ｐｅｘ１６、ＦＢＡＩＮ：：ＭΔ１２：：Ｐｅｘ２０、ＴＥＦ：：Δ６Ｓ：：Ｌｉｐ１、ＦＢＡＩＮ：：Δ６Ｓ：：Ｌｉｐ１、ＦＢＡＩＮ：：Ｅ１Ｓ：：Ｐｅｘ２０、ＧＰＡＴ：：Ｅ１Ｓ：：Ｏｃｔ、ＧＰＤＩＮ：：Ｅ１Ｓ：：Ｌｉｐ２、ＴＥＦ：：Ｅ２Ｓ：：Ｘｐｒ、ＦＢＡＩＮ：：ＭＡΔ５：：Ｐｅｘ２０、ＴＥＦ：：ＭＡΔ５：：Ｌｉｐ１、ＴＥＦ：：ＨΔ５Ｓ：：Ｐｅｘ１６、ＴＥＦ：：ＩΔ５Ｓ：：Ｐｅｘ２０、ＧＰＡＴ：：ＩＤ５Ｓ：：Ｐｅｘ２０、ＦＢＡＩＮ：：Δ１７Ｓ：：Ｌｉｐ２、ＦＢＡＩＮｍ：：Δ１７Ｓ：：Ｐｅｘ１６、ＴＥＦ：：Δ１７Ｓ：：Ｐｅｘ１６、および２Ｘ　ＴＥＦ：：ｒＥＬＯ２Ｓ：：Ｐｅｘ２０。
【０４６３】
Ｕｒａ－表現型による全脂質の約２１％のＥＰＡを生成するＹ２０９８Ｕ株の創生
一般方法に従って、ＳａｌＩ／ＰａｃＩ－消化コンストラクトｐＺＫＵＴ１６（配列番号１５９）を使用して、ＴＥＦ：：ｒＥＬＯ２Ｓ：：Ｐｅｘ２０キメラ遺伝子をＹ２０９８株のＵｒａ３遺伝子に組み込んだ。形質転換に続いて、細胞をＭＭ＋５－ＦＯＡ選択プレート上に播種し、３０℃に２～３日間保った。
【０４６４】
ＭＭ＋５－ＦＯＡプレート上に生育した全部で４８個の形質転換体を拾って、ＭＭプレートおよびＭＭ＋５－ＦＯＡプレート上に別々に再度画線培養した。ＭＭ＋５－ＦＯＡプ

レート上で生育できるが、ＭＭプレート上では生育できない株をＵｒａ－株として選択した。一般方法で記述されるようにして、これらの４８株の全部を二段階生育条件（すなわち４８時間のＭＭＵ、９６時間のＨＧＭ）を使用して分析した。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換によって脂肪酸メチルエステルを調製し、引き続いてヒューレットパッカード（Ｈｅｗｌｅｔｔ－Ｐａｃｋａｒｄ）６８９０　ＧＣで分析した。

【０４６５】

ＧＣ分析は、二段階生育後に、全てのｐＺＫＵＴ１６による形質転換体中に１２～２０％のＥＰＡの存在を示した。約２１％のＥＰＡを生成した１株（すなわち＃３３）を「Ｙ２０９８Ｕ」株と命名した。

【０４６６】

全脂質の５．６％を超えるＤＨＡを生成するＹ３０００株の創生

コンストラクトｐＺＰ２ＦＯＥＮ４（図９Ｅ、配列番号１６５）を使用して、２つのキメラ遺伝子のクラスター（合成Ｃ$_{20/22}$「ＯｔＥ２Ｓ」エロンガーゼおよび合成Δ４デサチュラーゼ「Ｄ４Ｓ」を含んでなる）をＹ２０９８Ｕ株のＰｏｘ２遺伝子部位に組み込んだ。プラスミドｐＺＰ２ＦＯＥＮ４は、以下の構成要素を含有した。

【０４６７】

【表３１】

表21

プラスミドpZP2FOEN4（配列番号165）の説明

配列番号165内のRE部位およびヌクレオチド	断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明
BsiWI/AscI（6152～6962）	ヤロウィアAco2遺伝子（ジェンバンク登録番号AJ001300）の810bpの5'部分
SphI/EcoRI（9670～10325）	ヤロウィアAco2遺伝子（ジェンバンク登録番号AJ001300）の655bpの3'部分
EcoRI/PacI（10640～2648）	以下を含んでなるYAT::Δ4S::Pex16 ● YATプロモーター：YAT1プロモーター（配列番号217） ● Δ4S：スラウストキトリウム・アウレウム由来コドン最適化Δ4デサチュラーゼ遺伝子（配列番号106）（ジェンバンク登録番号AAN75707） ● Pex16：ヤロウィアPex16遺伝子のPex16ターミネーター配列（ジェンバンク登録番号U75433）
EcoRVがあるEcoRI/SwaI（10618～8345）	以下を含んでなるFBAIN::OtE2S::Oct ● FBAIN：FBAINプロモーター（配列番号214） ● OtE2S：オストレオコッカス・タウリ由来コドン最適化OtE2S遺伝子（配列番号102）（ジェンバンク登録番号AY591336） ● OCT：ヤロウィアOCT遺伝子のOCTターミネーター配列（ジェンバンク登録番号X69988）
SpeIがあるSpeI/XbaI（12582～11095）	ヤロウィアUra3遺伝子（ジェンバンク登録番号AJ306421）

【０４６８】

プラスミドｐＺＰ２ＦＯＥＮ４をＳｐｈＩ／ＡｓｃＩで消化し、次に一般方法に従って使用してＹ２０９８Ｕ株を形質転換した。形質転換に続いて細胞をＭＭ選択培地プレート上に播種し、３０℃に２～３日間保った。ＭＭプレート上に生育した全部で２４個の形質転換体を拾って、新鮮なＭＭプレート上に再度画線培養した。生育したらこれらの株を３０℃の３ｍＬの液体中に個々に接種し、２５０ｒｐｍ／分で２日間振盪した。細胞を遠心

分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換によって脂肪酸メチルエステルを調製し、引き続いてヒューレットパッカード（Ｈｅｗｌｅｔｔ－Ｐａｃｋａｒｄ）６８９０ ＧＣで分析した。

【０４６９】

ＧＣ分析は、２４個の形質転換体の内１２個で、全脂質の約３．６～５．３％ＤＰＡおよび０．４～１％のＤＨＡが生成されたことを示した。二段階生育手順（すなわち４８時間のＭＭ、９６時間のＨＧＭ）を使用して、さらなる分析のためにＤＰＡおよびＤＨＡを生成する１２株を選択した。次に細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換によって脂肪酸メチルエステルを調製し、引き続いてヒューレットパッカード（Ｈｅｗｌｅｔｔ－Ｐａｃｋａｒｄ）６８９０ ＧＣで分析した。

【０４７０】

ＧＣ分析は、これらの１２個の形質転換体中で１５．６～２０％のＤＰＡおよび２．９～５．６％のＤＨＡが生成されたことを示した。５．６％のＤＨＡを生成した株をＹ３００株と命名した。

【０４７１】

実施例７

Ｕｒａ－遺伝子型を有し、全脂質の４５％のＬＡを生成する間性Ｙ２０３１株の創出

プラスミドｐＫＵＮＴ２のＴＥＦ：：Ｙ．Δ１２：：Ｐｅｘ２０キメラ遺伝子（図１０Ａ）を野性型ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）ＡＴＣＣ＃２０３６２株のＵｒａ３遺伝子遺伝子座に組み込むことでＵｒａ－遺伝子型を発生させて、Ｙ２０３１株を発生させた。

【０４７２】

具体的にはプラスミドｐＫＵＮＴ２は、以下の構成要素を含有した。

【０４７３】

【表３２】

表22

プラスミドpKUNT2（配列番号116）説明

配列番号 116 内の RE 部位およびヌクレオチド	断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明
AscI/BsiWI （3225～3015）	*ヤロウィア* Ura3 遺伝子（ジェンバンク登録番号 AJ306421）の 784bp の 5’ 部分
SphI/PacI （5933～13）	*ヤロウィア* Ura3 遺伝子（ジェンバンク登録番号 AJ306421）の 516bp の 3’ 部分
EcoRI/BsiWI （6380～8629）	以下を含んでなる TEF::Y.Δ12::Pex20 ● TEF：TEF プロモーター（ジェンバンク登録番号 AF054508） ● Y.Δ12：*ヤロウィア* Δ12 デサチュラーゼ遺伝子（配列番号 28） ● Pex20：*ヤロウィア* Pex20 遺伝子からの Pex20 ターミネーター配列（ジェンバンク登録番号 AF054613）

【０４７４】

ｐＫＵＮＴ２プラスミドをＡｓｃＩ／ＳｐｈＩで消化し、次に一般方法に従って、野性型Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＴＣＣ＃２０３６２の形質転換のために使用した。形質転換細胞をＦＯＡ選択培地プレート上に播種し、３０℃に２～３日間保った。ＦＯＡ抵抗性コロニーを拾って、ＭＭおよびＭＭＵ選択プレート上に画線培養した。ＭＭＵプレート上では生育できるがＭＭプレート上で生育できないコロニーをＵｒａ－株として選択した。次にＵｒａ－株の単一コロニー（５）を３０℃の液体ＭＭＵ中に接種し、２５０ｒｐｍ／分間で２日間振盪した。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換によって脂肪酸メチルエステルを調製し、引き続いてヒューレットパッカード（Ｈｅｗｌｅｔｔ－Ｐａｃｋａｒｄ）６８９０ ＧＣで分析した。

【０４７５】
ＧＣ分析は、野性型ＡＴＣＣ＃２０３６２中の約２０％のＬＡに対して、約４５％のＬＡが２つのＵｒａ－株（すなわち株＃２および＃３）中にあったことを示した。形質転換体株＃２を「Ｙ２０３１」株と命名した。
【０４７６】
実施例８
ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）におけるコドン最適化Δ９エロンガーゼ遺伝子の合成および機能的発現
国際公開第２００４／１０１７５３号パンフレットで述べられるのと同様にして、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中での発現のために、イソクリシス・ガルバナ（Ｉｓｏｃｈｒｙｓｉｓ　ｇａｌｂａｎａ）のΔ９エロンガーゼ遺伝子（ジェンバンク登録番号ＡＦ３９０１７４）のコドン使用頻度を最適化した。具体的には、ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）コドン使用頻度パターン、ＡＴＧ翻訳開始コドン周辺の共通配列、およびＲＮＡ安定性の一般法則（グハニヨギ（Ｇｕｈａｎｉｙｏｇｉ），Ｇ．およびＪ．ブルーアー（Ｂｒｅｗｅｒ）著、「Ｇｅｎｅ」　２６５（１～２）：１１～２３頁（２００１年））に従って、Ｉ．ガルバナ（ｇａｌｂａｎａ）遺伝子のＤＮＡ配列（配列番号６９）に基づいて、コドン最適化Δ９エロンガーゼ遺伝子（配列番号７１）をデザインした。翻訳開始部位の修正に加えて７９２ｂｐのコード領域の１２６ｂｐを修正し、１２３コドンを最適化した。コドン最適化遺伝子中のいずれの修正もコードされるタンパク質のアミノ酸配列（ジェンバンク登録番号ＡＦ３９０１７４、配列番号７０）を変化させなかった。
【０４７７】
ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）ためのコドン最適化Δ９エロンガーゼ遺伝子の生体外（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）合成
コドン最適化Δ９エロンガーゼ遺伝子を次のようにして合成した。最初に、８組のオリゴヌクレオチドをデザインし、Ｉ．ガルバナ（ｇａｌｂａｎａ）Δ９エロンガーゼ遺伝子のコドン最適化コード領域（例えばＩＬ３－１Ａ、ＩＬ３－１Ｂ、ＩＬ３－２Ａ、ＩＬ３－２Ｂ、ＩＬ３－３Ａ、ＩＬ３－３Ｂ、ＩＬ３－４Ａ、ＩＬ３－４Ｂ、ＩＬ３－５Ａ、ＩＬ３－５Ｂ、ＩＬ３－６Ａ、ＩＬ３－６Ｂ、ＩＬ３－７Ａ、ＩＬ３－７Ｂ、ＩＬ３－８Ａ、およびＩＬ３－８Ｂ、配列番号２９２～３０７に対応する）の全長を延長した。各５’－末端の４ｂｐのオーバーハングを除いて、センス（Ａ）およびアンチセンス（Ｂ）オリゴヌクレオチドの各対は相補的であった。さらに引き続くサブクローニングのために、プライマーＩＬ３－１Ｆ、ＩＬ３－４Ｒ、ＩＬ３－５Ｆ、およびＩＬ３－８Ｒ（配列番号３０８～３１１）にもまた、ＮｃｏＩ、ＰｓｔＩ、ＰｓｔＩ、およびＮｏｔ１制限部位を導入した。
【０４７８】
実施例４で記述されるようにして、オリゴヌクレオチド（各１００ｎｇ）をリン酸化し、次にセンスおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドの各対を混合して共にアニールした［例えばＩＬ３－１Ａ（配列番号２９２）をＩＬ３－１Ｂ（配列番号２９３）にアニールして二本鎖生成物「ＩＬ３－１ＡＢ」を生成し、ＩＬ３－２Ａ（配列番号２９４）をＩＬ３－２Ｂ（配列番号２９５）にアニールして二本鎖生成物「ＩＬ３－２ＡＢ」などを生成した］。
【０４７９】
次に下に示すように、アニールされた二本鎖オリゴヌクレオチドの２つの別々のプールを共にライゲートした。プール１（ＩＬ３－１ＡＢ、ＩＬ３－２ＡＢ、ＩＬ３－３ＡＢ、およびＩＬ３－４ＡＢを含んでなる）、およびプール２（ＩＬ３－５ＡＢ、ＩＬ３－６ＡＢ、ＩＬ３－７ＡＢ、およびＩＬ３－８ＡＢを含んでなる）。アニールされたオリゴヌクレオチドの各プールを２０μＬの容積で、１０ＵのＴ４ＤＮＡリガーゼと共に混合し、ライゲーション反応を１６℃で一晩インキュベートした。
【０４８０】
次に各ライゲーション反応生成物をテンプレートとして使用し、デザインされたＤＮＡ

断片をＰＣＲによって増幅した。具体的にはライゲートした「プール１」混合物（すなわち、ＩＬ３－１ＡＢ、ＩＬ３－２ＡＢ、ＩＬ３－３ＡＢおよびＩＬ３－４ＡＢ）をテンプレートとして、オリゴヌクレオチドＩＬ３－１ＦおよびＩＬ３－４Ｒ（配列番号３０８および３０９）をプライマーとして使用し、コドン最適化Δ９エロンガーゼ遺伝子の第１の部分をＰＣＲによって増幅した。ＰＣＲ増幅は実施例４で記述されるように、全容積５０μｌ中で実施した。４１７ｂｐのＰＣＲ断片をプロメガ（Ｐｒｏｍｅｇａ）からのｐＧＥＭ－Ｔイージーベクター中にサブクローンしてｐＴ９（１－４）を生じさせた。

【０４８１】

ライゲートした「プール２」混合物（すなわちＩＬ３－５ＡＢ、ＩＬ３－６ＡＢ、ＩＬ３－７ＡＢ、およびＩＬ３－８ＡＢ）をテンプレートとして、オリゴヌクレオチドＩＬ３－５FおよびＩＬ３－８Ｒ（配列番号３１０および３１１）をプライマーとして使用して、コドン最適化Δ９エロンガーゼ遺伝子の第２の部分を同様にＰＣＲによって増幅し、ｐＧＥＭ－Ｔ－イージーベクター中にクローンして、ｐＴ９（５－８）を発生させた。

【０４８２】

大腸菌（Ｅ．Ｃｏｌｉ）をｐＴ９（１－４）およびｐＴ９（５－８）で別々に形質転換し、プラスミドＤＮＡをアンピシリン抵抗性形質転換体から単離した。プラスミドＤＮＡを精製し、適切な制限エンドヌクレアーゼで消化して、ｐＴ９（１－４）の４１７ｂｐのＮｃｏＩ／ＰｓｔＩ断片（配列番号３１２）、およびｐＴ９（５－８）の３７７ｂｐのＰｓｔＩ／Ｎｏｔ１断片（配列番号３１３）を遊離した。次にこれらの２つの断片を組み合わせて、Ｎｃｏ１／Ｎｏｔ１で消化したｐＺＵＦ１７（配列番号１６２、図９Ｂ）と共に一方向性にライゲートして、ｐＤＭＷ２３７（図１０Ｂ、配列番号１６７）を発生させた。得られたｐＤＭＷ２３７中の合成Δ９エロンガーゼ遺伝子（「ＩｇＤ９ｅ」）のＤＮＡ配列は、ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）の最初にデザインされたコドン最適化遺伝子（すなわち配列番号７１）と全く同じであった。

【０４８３】

Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）におけるコドン最適化Δ９エロンガーゼ遺伝子の発現

一般方法で述べられるようにして、キメラＦＢＡＩＮ：：Ｉｇ　Ｄ９ｅ：：Ｐｅｘ２０遺伝子を含んでなる自律複製プラスミドであるコンストラクトｐＤＭＷ２３７（図１０Ｂ）をＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）Ｙ２０３１株（実施例７）に形質転換した。ｐＤＭＷ２３７によるＹ２０３１の３つの形質転換体をＭＭ培地中で２日間にわたり個別に生育させ、細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換によって脂肪酸メチルエステルを調製し、引き続いてヒューレットパッカード（Ｈｅｗｌｅｔｔ－Ｐａｃｋａｒｄ）６８９０　ＧＣで分析した。

【０４８４】

ＧＣ結果は、これらのｐＤＭＷ２３７による形質転換体中に、約７．１％、７．３％、および７．４％のＥＤＡがそれぞれ生成されたことを示した。これらのデータは、合成コドン最適化ＩｇＤ９ｅが、Ｃ１８：２をＥＤＡに変換できることを実証した。コドン最適化遺伝子の「パーセント（％）基質変換」は、約１３％と判定された。

【０４８５】

実施例９

ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）におけるコドン最適化Δ８デサチュラーゼ遺伝子の合成

国際公開第２００４／１０１７５３号パンフレットならびに実施例４および８（前出）で述べられるのと同様にして、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中での発現のために、ミドリムシ（Ｅｕｇｌｅｎａ　ｇｒａｃｉｌｉｓ）のΔ８デサチュラーゼ遺伝子（ジェンバンク登録番号ＡＡＤ４５８７７）のコドン使用頻度を最適化した。３個の異なるコドン最適化遺伝子（すなわち「Ｄ８Ｓ－１」、「Ｄ８Ｓ－２」、および「Ｄ８Ｓ－３」）の合成にもかかわらず、いずれの遺伝子もＥＤＡをＤＧＬＡに不飽和化できなかった。したがって以前公開されたΔ８デサチュラーゼ配列は不正確であり、ｍＲＮＡ単離、ｃ

ＤＮＡ合成、およびＰＣＲに続いて、ミドリムシ（Ｅｕｇｌｅｎａ　ｇｒａｃｉｌｉｓ）からΔ８デサチュラーゼを直接単離することが必要であると仮定された。この結果、２つの同様の配列が得られ、ここでＥｇ５（配列番号７７および７８）およびＥｇ１２（配列番号７９および８０）と同定された。

【０４８６】

遺伝子をサッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）酵母発現ベクター中にクローニングし、基質供給トライアルを行って、各遺伝子配列の機能分析を実施した。Ｅｇ５およびＥｇ１２のどちらもＥＤＡおよびＥＴｒＡをＤＧＬＡおよびＥＴＡにそれぞれ不飽和化できたが、Ｅｇ５はＥｇ１２よりも顕著に大きな活性を有した。

【０４８７】

Ｅｇ５の立証されたΔ８デサチュラーゼ活性に基づいて、配列をヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中での発現のためにコドン最適化し、それによって「Ｄ８ＳＦ」（配列番号８１および８２）と命名された合成機能性コドン最適化Δ８デサチュラーゼの合成をもたらした。

【０４８８】

コドン最適化Δ８デサチュラーゼ遺伝子の予備的生体外（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）合成

ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）コドン使用頻度パターン（国際公開第２００４／１０１７５３号パンフレット）、「ＡＴＧ」翻訳開始コドン周辺の共通配列、およびＲＮＡ安定性の一般法則グハニヨギ（Ｇｕｈａｎｉｙｏｇｉ），Ｇ．およびＪ．ブルーアー（Ｂｒｅｗｅｒ）著、「Ｇｅｎｅ」　２６５（１～２）：１１～２３頁（２００１年））に従って、ミドリムシ（Ｅｕｇｌｅｎａ　ｇｒａｃｉｌｉｓ）の公開配列（配列番号７２および７３）に基づいて、コドン最適化Δ８デサチュラーゼ遺伝子（「Ｄ８Ｓ－１」と命名された、配列番号７５）をデザインした。翻訳開始部位の修正に加えて１２６０ｂｐのコード領域の２００ｂｐ（１５．９％）を修正した。第２のアミノ酸を「Ｋ」から「Ｅ」に変化させてＮｃｏＩ部位を翻訳開始コドン周辺に付加させたことを除いて、コドン最適化遺伝子中のいずれの修正もコードされるタンパク質のアミノ酸配列（配列番号７３）を変化させなかった。

【０４８９】

具体的には、コドン最適化Δ８デサチュラーゼ遺伝子を次のようにして合成した。最初に１３組のオリゴヌクレオチドをデザインして、ミドリムシ（Ｅ．ｇｒａｃｉｌｉｓ）Δ８デサチュラーゼ遺伝子のコドン最適化コード領域（例えばＤ８－１Ａ、Ｄ８－１Ｂ、Ｄ８－２Ａ、Ｄ８－２Ｂ、Ｄ８－３Ａ、Ｄ８－３Ｂ、Ｄ８－４Ａ、Ｄ８－４Ｂ、Ｄ８－５Ａ、Ｄ８－５Ｂ、Ｄ８－６Ａ、Ｄ８－６Ｂ、Ｄ８－７Ａ、Ｄ８－７Ｂ、Ｄ８－８Ａ、Ｄ８－８Ｂ、Ｄ８－９Ａ、Ｄ８－９Ｂ、Ｄ８－１０Ａ、Ｄ８－１０Ｂ、Ｄ８－１１Ａ、Ｄ８－１１Ｂ、Ｄ８－１２Ａ、Ｄ８－１２Ｂ、Ｄ８－１３Ａ、およびＤ８－１３Ｂ、配列番号３１４～３３９に対応する）の全長を延長した。各５’－末端の４ｂｐのオーバーハングを除いて、センス（Ａ）およびアンチセンス（Ｂ）オリゴヌクレオチドの各組は相補的であった。さらに引き続くサブクローニングのために、プライマーＤ８－１Ａ、Ｄ８－３Ｂ、Ｄ８－７Ａ、Ｄ８－９Ｂ、およびＤ８－１３Ｂ（配列番号３１４、３１９、３２６、３３１、および３３９）もまた、ＮｃｏＩ、ＢｇｌＩＩ、Ｘｈｏ１、ＳａｃＩ、およびＮｏｔ１制限部位にそれぞれ導入された。

【０４９０】

実施例４で述べられるようにして、オリゴヌクレオチド（各１００ｎｇ）をリン酸化し、次に各センスおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドの対を混合し、共にアニールした［例えばＤ８－１Ａ（配列番号３１４）をＤ８－１Ｂ（配列番号３１５）にアニールして二本鎖生成物「Ｄ８－１ＡＢ」を生成し、Ｄ８－２Ａ（配列番号３１６）をＤ８－２Ｂ（配列番号３１６）にアニールして二本鎖生成物「Ｄ８－２ＡＢ」などを生成した］。

【０４９１】

次にアニールされた二本鎖オリゴヌクレオチドの４つの別個のプールを以下に示すよう

に共にライゲートした。プール１（Ｄ８－１ＡＢ、Ｄ８－２ＡＢ、およびＤ８－３ＡＢを含んでなる）、プール２（Ｄ８－４ＡＢ、Ｄ８－５ＡＢ、およびＤ８－６ＡＢを含んでなる）、プール３（Ｄ８－７ＡＢ、Ｄ８－８ＡＢ、およびＤ８－９ＡＢを含んでなる）、およびプール４（Ｄ８－１０ＡＢ、Ｄ８－１１ＡＢ、Ｄ８－１２ＡＢ、およびＤ８－１３ＡＢを含んでなる）。アニールされたオリゴヌクレオチドの各プールを２０μＬの容積で１０ＵのＴ４ＤＮＡリガーゼと共に混合し、ライゲーション反応を１６℃で一晩インキュベートした。

【０４９２】

次に各ライゲーション反応の生成物をテンプレートとして使用し、デザインされたＤＮＡ断片をＰＣＲによって増幅した。具体的には、ライゲートした「プール１」混合物（すなわちＤ８－１ＡＢ、Ｄ８－２ＡＢ、およびＤ８－３ＡＢ）をテンプレートとして、オリゴヌクレオチドＤ８－１ＦおよびＤ８－３Ｒ（配列番号３４０および３４１）をプライマーとして使用して、コドン最適化Δ８デサチュラーゼ遺伝子の第１の部分をＰＣＲによって増幅した。実施例４で述べられるようにして５０μＬの全容積でＰＣＲ増幅を実施した。３０９ｂｐのＰＣＲ断片をプロメガプロメガ（Ｐｒｏｍｅｇａ）からのｐＧＥＭ－Ｔイージーベクター中にサブクローンしてｐＴ８（１－３）を発生させた。

【０４９３】

ライゲートした「プール２」混合物（すなわちＤ８－４ＡＢ、Ｄ８－５ＡＢ、およびＤ８－６ＡＢ）をテンプレートとして、オリゴヌクレオチドＤ８－４ＦおよびＤ８－６Ｒ（配列番号３４２および３４３）をプライマーとして使用して、コドン最適化Δ８デサチュラーゼ遺伝子の第２の部分をＰＣＲによって同様に増幅し、ｐＧＥＭ－Ｔ－イージーベクター中にクローンしてｐＴ８（４－６）を発生させた。ライゲートした「プール３」混合物（すなわちＤ８－７ＡＢ、Ｄ８－８ＡＢ、およびＤ８－９ＡＢ）をテンプレートとして、オリゴヌクレオチドＤ８－７ＦおよびＤ８－９Ｒ（配列番号３４４および３４５）をプライマーとして使用して、コドン最適化Δ８デサチュラーゼ遺伝子の第３の部分をＰＣＲによって同様に増幅し、ｐＧＥＭ－Ｔ－イージーベクター中にクローンしてｐＴ８（７－９）を発生させた。最後に「プール４」ライゲーション混合物（すなわちＤ８－１０ＡＢ、Ｄ８－１１ＡＢ、Ｄ８－１２ＡＢ、およびＤ８－１３ＡＢ）をテンプレートとして、オリゴヌクレオチドＤ８－１０ＦおよびＤ８－１３Ｒ（配列番号３４６および３４７）をプライマーとして使用して、コドン最適化Δ８デサチュラーゼ遺伝子の第４の部分をＰＣＲによって同様に増幅し、ｐＧＥＭ－Ｔ－イージーベクター中にクローンしてｐＴ８（１０－１３）を発生させた。

【０４９４】

大腸菌（Ｅ．Ｃｏｌｉ）をｐＴ８（１－３）、ｐＴ８（４－６）、ｐＴ８（７－９）、およびｐＴ８（１０－１３）で別々に形質転換して、アンピシリン抵抗性形質転換体からプラスミドＤＮＡを単離した。プラスミドＤＮＡを精製し、適切な制限エンドヌクレアーゼで消化して、ｐＴ８（１－３）（配列番号３４８）の３０９ｂｐのＮｃｏＩ／ＢｇｌＩＩ断片、ｐＴ８（４－６）（配列番号３４９）の３２１ｂｐのＢｇｌＩＩ／ＸｈｏＩ断片、ｐＴ８（７－９）（配列番号３５０）の２６４ｂｐのＸｈｏＩ／ＳａｃＩ断片、およびｐＴ８（１０－１３）（配列番号３５１）の３６９ｂｐのＳａｃ１／Ｎｏｔ１断片を遊離した。次にこれらの断片を組み合わせて、Ｎｃｏ１／Ｎｏｔ１消化ｐＹ５４ＰＣ（配列番号１６８、国際公開第２００４／１０１７５７号パンフレット）と共に一方向性にライゲートして、ｐＤＭＷ２４０（図１０Ｃ）を発生させた。これによってｐＤＭＷ２４０中に合成Δ８デサチュラーゼ遺伝子（「Ｄ８Ｓ－１」、配列番号７５）が得られた。

【０４９５】

公開されたミドリムシ（Ｅ．ｇｒａｃｉｌｉｓ）のΔ８デサチュラーゼアミノ酸配列（配列番号７３）と比較して、Ｄ８Ｓ－１の第２のアミノ酸では、ＮｃｏＩ部位を翻訳開始コドン周辺に付加するために「Ｋ」を「Ｅ」に変化させた。ｐＤＭＷ２４０をテンプレートとして、オリゴヌクレオチドＯＤＭＷ３９０およびＯＤＭＷ３９１（配列番号３５２および３５３）をプライマーとして使用して、生体外（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）変異誘発によっ

て（カリフォルニア州サンディエゴのストラタジーン（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ））、公開されたミドリムシ（Ｅ．ｇｒａｃｉｌｉｓ）Δ８デサチュラーゼ配列（配列番号７３）と全く同じアミノ酸配列を有する合成遺伝子の別のバージョンを構築した。得られたプラスミドをｐＤＭＷ２５５と命名した。ｐＤＭＷ２５５中の合成Δ８デサチュラーゼ遺伝子を「Ｄ８Ｓ－２」と命名し、アミノ酸配列は配列番号７３で記載される配列と全く同じであった。

【０４９６】

非機能性コドン最適化Δ８デサチュラーゼ遺伝子

一般方法で述べられるようにして、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）株ＡＴＣＣ＃７６９８２（Ｌｅｕ－）をｐＤＭＷ２４０（図１０Ｃ）およびｐＤＭＷ２５５でそれぞれ形質転換した。組換えコンストラクトを含有する酵母をＥＤＡ［２０：２（１１，１４）］で栄養強化されたＭＭ中で生育させた。具体的には、ｐＤＭＷ２４０（Ｄ８Ｓ－１を含有する）またはｐＤＭＷ２５５（Ｄ８Ｓ－２を含有する）のどちらかを含有する形質転換体Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）の単一コロニーを３ｍＬのＭＭ中でOD_{600}約１．０に３０℃で生育させた。次に基質供給のために、１０μｇのＥＤＡ基質を含有する３ｍＬのＭＭ中で、１００μＬの細胞を３０℃で約２４時間継代培養した。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換によって脂肪酸メチルエステルを調製し、引き続いてヒューレットパッカード（Ｈｅｗｌｅｔｔ－Ｐａｃｋａｒｄ）６８９０ ＧＣで分析した。

【０４９７】

どちらの形質転換体もＥＤＡからＤＧＬＡを生成しなかったので、Ｄ８Ｓ－１およびＤ８Ｓ－２は機能性でなく、ＥＤＡを不飽和化できなかった。キメラＤ８Ｓ－１：：ＸＰＲおよびＤ８Ｓ－２：：ＸＰＲ遺伝子は、それぞれ配列番号３５４および３５５で示される。

【０４９８】

ジェンバンク（登録番号ＡＡＤ４５８７７［配列番号７３］）に寄託されたΔ８デサチュラーゼのタンパク質配列、および国際公開第００／３４４３９号パンフレットまたはウォーリス（Ｗａｌｌｉｓ）ら（Ａｒｃｈｉｖｅｓ ｏｆ Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ、３６５：３０７～３１６（１９９９年））（ここでの配列番号７４）の間に、３個のアミノ酸の違いが見いだされた。具体的にはジェンバンク登録番号ＡＡＤ４５８７７には、３個のアミノ酸が欠落しているように見えた。ｐＤＭＷ２５５をテンプレートとして、ＯＤＭＷ３９２およびＯＤＭＷ３９３（配列番号３５６および３５７）をプライマーとして使用して、生体外（ｉｎ ｖｉｔｒｏ）変異誘発（カリフォルニア州サンディエゴのストラタジーン（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ））によって９ｂｐを合成Ｄ８Ｓ－２遺伝子に付加することで、国際公開第００／３４４３９号パンフレットおよびウォーリス（Ｗａｌｌｉｓ）ら（前出）（配列番号７４）で述べられる配列と同一のタンパク質を生成した。得られたプラスミドをｐＤＭＷ２６１と称した。ｐＤＭＷ２６１中の合成Δ８デサチュラーゼ遺伝子を「Ｄ８Ｓ－３」（配列番号７６）と命名した。ｐＤＭＷ２６１コンストラクトのヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）中への形質転換に続いて、上述のようにＥＤＡを使用して同様の供給実験を行った。Ｄ８Ｓ－３では、ＥＤＡのＤＧＬＡへの不飽和化は観察されなかった。

【０４９９】

ミドリムシ（Ｅｕｇｌｅｎａ ｇｒａｃｉｌｉｓ）Δ８デサチュラーゼ遺伝子の単離

ミシガン州イーストランシングのミシガン州立大学のリチャード・トリーマー（Ｒｉｃｈａｒｄ Ｔｒｉｅｍｅｒ）博士の研究室からミドリムシ（Ｅｕｇｌｅｎａ ｇｒａｃｉｌｉｓ）を得た。１０ｍＬの活発に生育する培養から、１ｍＬのアリコートを５００ｍＬガラスびん中の２５０ｍＬのミドリムシ（Ｅｕｇｌｅｎａ ｇｒａｃｉｌｉｓ）（Ｅｇ）培地に移した。９７０ｍＬの水中で１ｇの酢酸ナトリウム、ミシガン州デトロイトのディフコ・ラボラトリーズ（Ｄｉｆｃｏ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（Ｄｅｔｒｏｉｔ，ＭＩ））からの１ｇの牛肉エキス（カタログ番号Ｕ１２６－０１）、ディフコ・ラボラトリー

ズ（Ｄｉｆｃｏ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（Ｄｅｔｒｏｉｔ，ＭＩ））からの２ｇのバクト（Ｂａｃｔｏ）（登録商標）トリプトン（カタログ番号０１２３－１７－３）、およびディフコ・ラボラトリーズ（Ｄｉｆｃｏ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（Ｄｅｔｒｏｉｔ，ＭＩ））からの２ｇのバクト（Ｂａｃｔｏ）（登録商標）酵母抽出物（カタログ番号０１２７－１７－９）を合わせてＥｇ培地を作製した。フィルター滅菌後、ノースカロライナ州バーリントンのカロライナ・バイオロジカル・サプライ・カンパニー（Ｃａｒｏｌｉｎａ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｓｕｐｐｌｙ Ｃｏｍｐａｎｙ（Ｂｕｒｌｉｎｇｔｏｎ，ＮＣ）からの３０ｍＬの土壌上清（Ｓｏｉｌ－Ｗａｔｅｒ Ｓｕｐｅｒｎａｔａｎｔ）（カタログ番号１５－３７９０）を無菌的に添加して最終的なＥｇ培地を生成した。ミドリムシ（Ｅ．ｇｒａｃｉｌｉｓ）培養物を２３℃で１６時間の照明、８時間の暗黒サイクルで撹拌せずに２週間生育させた。

【０５００】

２週間後、脂質分析のために１０ｍＬの培養を取り除いて１，８００×ｇで５分間遠心分離した。ペレットを水で１度洗浄し、再遠心分離した。得られたペレットを真空下で５分間乾燥させ、１００μＬの水酸化トリメチルスルホニウム（ＴＭＳＨ）に再懸濁し、振盪しながら室温で１５分間インキュベートした。その後、０．５ｍＬのヘキサンを添加して、バイアルを振盪しながら室温で１５分間インキュベートした。脂肪酸メチルエステル（ヘキサン層から注入された５μＬ）を分離して、スペルコ（Ｓｕｐｅｌｃｏ Ｉｎｃ．）からのオメガワックス（Ｏｍｅｇａｗａｘ）３２０融解石英キャピラリーカラム（カタログ番号２４１５２）を装着した（Ｈｅｗｌｅｔｔ－Ｐａｃｋａｒｄ）６８９０ガスクロマトグラフを使用して定量化した。オーブン温度をプログラムして２２０℃に２．７分間保ち、２０℃／分で２４０℃に上昇させて、次にさらに２．３分間保った。ワットマン（Ｗｈａｔｍａｎ）水素発生器によってキャリアガスを供給した。ヌチェック・プレップ（Ｎｕ－Ｃｈｅｋ Ｐｒｅｐ，Ｉｎｃ．）から市販される標準メチルエステル（カタログ番号Ｕ－９９－Ａ）と滞留時間を比較して、得られたクロマトグラムを図１１に示す。

【０５０１】

１，８００×ｇで１０分間の遠心分離によって残った２週間培養物（２４０ｍＬ）をペレット化し、水で１度洗浄して再遠心分離した。テキサス州フレンズウッドのテルーテスト（ＴＥＬ－ＴＥＳＴ，Ｉｎｃ．（Ｆｒｉｅｎｄｓｗｏｏｄ，ＴＸ））からのＲＮＡ ＳＴＡＴ－６０（商標）試薬を使用して、提供された製造業者のプロトコル（５ｍＬの試薬を使用してＲＮＡを０．５ｍＬの水に溶解）に従って、得られたペレットから全ＲＮＡを抽出した。このようにして、ペレットから１ｍｇの全ＲＮＡ（２ｍｇ／ｍＬ）を得た。ニュージャージー州ピスカタウェイのアマシャム・バイオサイエンス（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ））からのｍＲＮＡ精製キットを使用して、提供された製造業者のプロトコルに従って、１ｍｇの全ＲＮＡからｍＲＮＡを単離した。このようにして８５μｇのｍＲＮＡを得た。

【０５０２】

カリフォルニア州カールズバッドのインビトロジェン・ライフ・テクノロジーズ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（商標）Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ））からのｃＤＮＡ合成用スーパースクリプト（ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ）（商標）選択システムを使用して、製造業者のプロトコルに従って、提供されるオリゴ（ｄＴ）プライマーによって、７６５ｎｇのｍＲＮＡからｃＤＮＡを合成した。合成されたｃＤＮＡを２０μＬの水に溶解した。

【０５０３】

下で述べられる条件を使用して、オリゴヌクレオチドプライマーＥｇ５－１およびＥｇ３－３（配列番号３５８および３５９）で、ｃＤＮＡからミドリムシ（Ｅ．ｇｒａｃｉｌｉｓ）Δ８デサチュラーゼを増幅した。具体的には、ｃＤＮＡ（１μＬ）を５０ピコモルのＥｇ５－１、５０ピコモルのＥｇ５－１、ウイスコンシン州マディソンのプロメガ（Ｐｒｏｍｅｇａ（Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ））からの１μＬのＰＣＲヌクレオチドミクス（１０ｍＭ）、インヴィトロジェン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）からの５μＬの１０×ＰＣＲ緩

衝液、インヴィトロジェン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）からの１．５μＬのＭｇＣｌ$_2$（５０ｍＭ）、インヴィトロジェン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）からの０．５μＬのＴａｑポリメラーゼと合わせ、水で５０μＬにした。反応条件は９４℃で３分間、続いて９４℃で４５秒間、５５℃で４５秒間および７２℃で１分間を３５サイクルであった。ＰＣＲを７２℃で７分間で終了し、次に４℃に保った。５μＬに対するアガロースゲル電気泳動法によってＰＣＲ反応を分析し、分子量１．３ｋＢ前後のＤＮＡバンドが観察された。残る４５μＬの生成物をアガロースゲル電気泳動法によって分離して、カリフォルニア州オレンジのザイモリサーチ（Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ（Ｏｒａｎｇｅ，ＣＡ））からのザイモクリーン（Ｚｙｍｏｃｌｅａｎ）（商標）ゲルＤＮＡ回収キットを使用して、製造業者のプロトコルに従ってＤＮＡバンドを精製した。得られたＤＮＡを製造業者のプロトコルに従って、プロメガプロメガ（Ｐｒｏｍｅｇａ）からのｐＧＥＭ（登録商標）－Ｔイージーベクター中にクローンした。Ｔ７、Ｍ１３－２８Ｒｅｖ、Ｅｇ３－２、およびＥｇ５－２（それぞれ配列番号３６０～３６３）を使用して複数クローンを配列決定した。

【０５０４】

このようにして、数ｂｐのみが異なるＥｇ５（配列番号７７）およびＥｇ１２（配列番号７９）の２つのクラスのＤＮＡ配列が得られた。Ｅｇ５およびＥｇ１２の翻訳からは、それぞれ配列番号７８および８０の１個のアミノ酸のみが異なる、タンパク質配列が生じた。したがってＥｇ５のＤＮＡおよびタンパク質配列はそれぞれ配列番号７７および配列番号７８で記載され、Ｅｇ１２のＤＮＡおよびタンパク質配列はそれぞれ配列番号７９および配列番号８０で記載される。

【０５０５】

単離されたミドリムシ（Ｅ．ｇｒａｃｉｌｉｓ）Δ８デサチュラーゼ配列と公開されたミドリムシ（Ｅ．ｇｒａｃｉｌｉｓ）Δ８デサチュラーゼ配列との比較

配列番号７８（Ｅｇ５）および配列番号８０（Ｅｇ１２）に記載されるタンパク質配列とジェンバンク登録番号ＡＡＤ４５８７７（ｇｉ：５６３９７２４、ここでの配列番号７３）からのタンパク質配列、およびウォーリス（Ｗａｌｌｉｓ）ら（Ａｒｃｈｉｖｅｓ　ｏｆ　Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．、３６５：３０７～３１６ページ（１９９９年）、国際公開第００／３４４３９号パンフレット）［ここでの配列番号７４］の公開されたタンパク質配列とのアラインメントを図１２に示す。４つの全配列で保存されたアミノ酸をアステリスク（＊）で示した。ダッシュは、プログラムによって配列の整列化を最大化するために使用された。推定上のチトクロームｂ$_5$領域には下線を引いた。推定上のＨｉｓ　ｂｏｘを太字で示す。％同一性の計算からは、Ｅｇ５Δ８デサチュラーゼタンパク質の配列が配列番号７３と９５．５％同一であり、配列番号７４と９６．２％同一であることが明らかになり、ここで「％同一性」とは２つのタンパク質間で同一のアミノ酸の百分率として定義される。アラインメントおよび％同一性の計算は、ウィスコンシン州マディソンのＤＮＡＳＴＡＲ（ＤＮＡＳＴＡＲ，Ｉｎｃ．（Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ））からのレーザージーン（ＬＡＳＥＲＧＥＮＥ）バイオインフォマティクス計算スイートのメガライン（Ｍｅｇａｌｉｇｎ）プログラムを使用して実施した。配列の多重整列化は、デフォルトパラメーター（ＧＡＰ　ＰＥＮＡＬＴＹ＝１０、ＧＡＰ　ＬＥＮＧＴＨ　ＰＥＮＡＬＴＹ＝１０）のクラスタル（Ｃｌｕｓｔａｌ）アラインメント法（ヒギンズ（Ｈｉｇｇｉｎｓ）およびシャープ（Ｓｈａｒｐ）著、ＣＡＢＩＯＳ．５：１５１～１５３頁（１９８９年））を使用して実施した。クラスタル（Ｃｌｕｓｔａｌ）法を使用したペアワイズアラインメントのデフォルトパラメーターは、ＫＴＵＰＬＥ　１、ＧＡＰＰＥＮＡＬＴＹ＝３、ＷＩＮＤＯＷ＝５、およびＤＩＡＧＯＮＡＬＳ　ＳＡＶＥＤ＝５であった。様々なミドリムシ（Ｅ．ｇｒａｃｉｌｉｓ）Δ８デサチュラーゼ配列間の違いのより完全な分析については、同時係属米国特許出願第１１／１６６９９３号を参照されたい。

【０５０６】

サッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中のミドリムシ（Ｅｕｇｌｅｎａ　ｇｒａｃｉｌｉｓ）Δ８デサチュラーゼ配列の機能分析

酵母エピソームのプラスミド（ＹＥｐ）－タイプベクターｐＲＳ４２５（クリスチャンソン（Ｃｈｒｉｓｔｉａｎｓｏｎ）ら著、「Ｇｅｎｅ」、１１０：１１９～２２頁（１９９２年））は、サッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）２μ内在性プラスミドからの配列、ＬＥＵ２選択マーカー、および多官能性ファージミドｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＩＩ ＳＫ＋の主鎖ベースの配列を含有する。ジア（Ｊｉａ）ら著、Ｐｈｙｓｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ、３：８３～９２頁（２０００年）で述べられるのと同様にして、Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）の強力な構成グリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＰＤ）プロモーターをｐＲＳ４２５のＳａｃＩＩとＳｐｅＩ部位の間でクローンして、ｐＧＰＤ－４２５を生成した。ＮｏｔＩ部位をｐＧＰＤ－４２５のＢａｍＨＩ部位に導入し（したがってＢａｍＨＩ部位が側面にあるＮｏｔＩ部位を生成する）、それによってプラスミドｐＹ－７５をもたらした。ＮｏｔＩで消化して、Ｅｇ５（配列番号７７）およびＥｇ１２（配列番号７９）を上述のｐＧＥＭ（登録商標）－Ｔイージーベクターから放出し、ｐＹ－７５のＮｏｔＩ部位中にクローンして、ｐＹ８９－５（ＡＴＣＣ＃ＰＴＡ－６０４８として寄託した）およびｐＹ８９－１２をそれぞれ生成した。このようにしてΔ８デサチュラーゼ（すなわちＥｇ５［配列番号７７］およびＥｇ１２［配列番号７９］）をＳ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中での発現のための強力な構成プロモーターの後方でクローンした。ｐＹ８９－５の遺伝子地図を図１０Ｄに示す。

【０５０７】

標準酢酸リチウム形質転換手順を使用して、プラスミドｐＹ８９－５、ｐＹ８９－１２、およびｐＹ－７５をサッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）ＢＹ４７４１（ＡＴＣＣ＃２０１３８８）に形質転換した。カリフォルニア州カールズバッドのキュビオジーン（Ｑｂｉｏｇｅｎｅ（Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ））からのＣＳＭ－ｌｅｕで栄養強化されたＤＯＢＡ培地上で、形質転換体を選択した。各プレートからの形質転換体をキュビオジーン（Ｑｂｉｏｇｅｎｅ）からのＣＳＭ－ｌｅｕで栄養強化された２ｍＬのＤＯＢ培地中に接種し、３０℃で１日間生育させ、その後０．５ｍＬを１ｍＭのＥＤＡまたはＥｔｒＡのどちらかで栄養強化された同一培地に移した。これらを２５０ｒｐｍ、３０℃で一晩インキュベートして、遠心分離によってペレットを得て真空下で乾燥させた。ペレットを５０μＬのＴＭＳＨでエステル交換して、一般方法で述べられるようにしてＧＣによって分析した。ｐＹ－７５（すなわちクローン７５－１および７５－２）およびｐＹ８９－５（すなわちクローン５－６－１および５－６－２）の２つのクローンをそれぞれ分析する一方、２つの独立した形質転換からのｐＹ８９－１２の２揃いのクローン（すなわちクローン１２－８－１、１２－８－２、１２－９－１、および１２－９－２）を分析した。

【０５０８】

ＥＤＡを供給されたクローンのＧＣ分析によって得られた脂質プロフィールを表２３に示す。ＥｔｒＡを供給されたクローンのＧＣ分析によって得られた脂質プロフィールを表２４に示す。脂肪酸は１６：０（パルミチン酸）、１６：１（パルミトレイン酸）、１８：０、１８：１（オレイン酸）、２０：２［ＥＤＡ］、２０：３（８，１１，１４）［ＤＧＬＡ］、２０：３（１１，１４，１７）［ＥＴｒＡ］および２０：４（８，１１，１４，１７）［ＥＴＡ］と同定され、それぞれの組成は全脂肪酸の％として表される。

【０５０９】

【表３３】

表 23
ミドリムシΔ8デサチュラーゼを過剰発現する形質転換
S.セレヴィシエの脂質分析：EDA 基質供給

クローン	16:0	16:1	18:0	18:1	20:2	20:3 (8,11,14)	%20:2 転換
75-1（対照）	14	32	5	38	10	0	0
75-2（対照）	14	31	5	41	9	0	0
5-6-1（Eg5）	14	32	6	40	6	2	24
5-6-2（Eg5）	14	30	6	41	7	2	19
12-8-1（Eg12）	14	30	6	41	9	1	7
12-8-2（Eg12）	14	32	5	41	8	1	8
12-9-1（Eg12）	14	31	5	40	9	1	8
12-9-2（Eg12）	14	32	5	41	8	1	7

【０５１０】
【表３４】

表24
ミドリムシΔ8デサチュラーゼを過剰発現する形質転換
S.セレヴィシエの脂質分析：ETrA基質供給

クローン	16:0	16:1	18:0	18:1	20:3 (11,14,17)	20:4 (8,11,14,17)	%20:3 転換
75-1（対照）	12	25	5	33	24	0	0
75-2（対照）	12	24	5	36	22	1	5
5-6-1（Eg5）	13	25	6	34	15	7	32
5-6-2（Eg5）	13	24	6	34	17	6	27
12-8-1（Eg12）	12	24	5	34	22	2	8
12-8-2（Eg12）	12	25	5	35	20	2	9
12-9-1（Eg12）	12	24	5	34	22	2	9
12-9-2（Eg12）	12	25	6	35	20	2	9

【０５１１】
表２３および２４０中のデータは、クローンされたミドリムシ（Ｅｕｇｌｅｎａ）Δ８デサチュラーゼがＥＤＡおよびＥｔｒＡを不飽和化できたことを示した。配列番号８０で記載される配列は、配列番号７８で記載される配列と比べて１個のアミノ酸変化を有し、低下したΔ８デサチュラーゼ活性を有する。
【０５１２】
表２４中のクローン７５－２によって発生した少量の２０：４（８，１１，１４，１７）は、２０：４（８，１１，１４，１７）の標準とは、わずかに異なる滞留時間を有した。このピークは、この実験中の野生型酵母によって発生した少量の異なる脂肪酸である可能性が高い。
【０５１３】
ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）のために最適化

されたΔ８デサチュラーゼ遺伝子コドンのさらなる修正
ｐＤＭＷ２６１中の合成Ｄ８Ｓ－３遺伝子のアミノ酸配列は、機能性ミドリムシΔ８デサチュラーゼ（配列番号７７および７８）のアミノ酸配列に従って補正した。ｐＤＭＷ２６１をテンプレートとして、およびオリゴヌクレオチドＯＤＭＷ４０４（配列番号３６４）およびＤ８－１３Ｒ（配列番号３４７）を使用して、合成Ｄ８Ｓ－３デサチュラーゼ遺伝子をコードするＤＮＡ断片を増幅した。得られたＰＣＲ断片をバイオ１０１（Ｂｉｏ１０１）のジーンクリーンキット（Ｇｅｎｅｃｌｅａｎ　ｋｉｔ）で精製し、引き続いてＫｐｎ１およびＮｏｔ１で消化した（プライマーＯＤＭＷ４０４がＫｐｎＩ部位を導入したのに対し、プライマーＤ８－１３ＲはＮｏｔＩ部位を導入した）。Ｋｐｎ１／Ｎｏｔ１断片（配列番号３６５）をＫｐｎ１／Ｎｏｔ１消化ｐＫＵＮＦｍＫＦ２（図１０Ｅ、配列番号１４６）中にクローンして、ｐＤＭＷ２７７を生成した（図１３Ａ）。
【０５１４】
ｐＤＭＷ２７７がテンプレートとして使用される別のＰＣＲ反応において、Ｄ８Ｓ－３遺伝子の５’末端を増幅し補正するようにデザインされたオリゴヌクレオチドＹＬ５２１およびＹＬ５２２（配列番号３６６および３６７）をプライマーとして使用した。プライマーはそれぞれ５’および３’末端で、ＰＣＲ断片中のＮｃｏ１部位およびＢｇｌＩＩ部位に導入された。３１８ｂｐＰＣＲ生成物をバイオ１０１（Ｂｉｏ１０１）のジーンクリーンキットで精製し、引き続いてＮｃｏ１およびＢｇｌＩＩで消化した。消化断片をｐＤＭＷ２７７からの９５４ｂｐ　ＢｇｌＩＩ／ＮｏｔＩ断片と共に使用して、ｐＺＦ５Ｔ－ＰＰＣのＮｃｏＩ／ＮｏｔＩ断片と交換し（図１３Ｂ、配列番号１７０）、ｐＤＭＷ２８７を形成した。合成Ｄ８Ｓ－３遺伝子の５’末端を補正するのに加えて、このクローニング反応はまた、合成Δ８デサチュラーゼ遺伝子をヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＦＢＡＩＮプロモーター（配列番号２１４）の調節下に置いた。
【０５１５】
次に部位特異的変異誘発反応の最終シリーズの第１の反応をｐＤＭＷ２８７で行った。第１の一揃いのプライマーであるＹＬ５２５およびＹＬ５２６（配列番号３６８および３６９）は、ｐＤＭＷ２８７中の合成Ｄ８Ｓ－３遺伝子アミノ酸をＦからＳ（５０位）に補正するようにデザインされた。次にこの変異誘発反応から得られたプラスミドが、プライマーＹＬ５２７およびＹＬ５２８（配列番号３７０および３７１）による次の部位特異的変異誘発反応のためのテンプレートになった。これらのプライマーは、Ｄ８Ｓ－３遺伝子のアミノ酸をＦからＳ（６７位）に補正するようにデザインされ、プラスミドｐＤＭＷ２８７／ＹＬ５２７の創生をもたらした。
【０５１６】
遺伝子の第２の四半分内の配列補正を完了するために、遺伝子の第１の四半分に対する突然変異と当時に、以下の反応を実施した。ｐＤＭＷ２８７をテンプレートとして、オリゴヌクレオチドＹＬ５２９およびＹＬ５３０（配列番号３７２および３７３）をプライマーとして使用して、生体外（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）変異誘発反応を実施して、合成Ｄ８Ｓ－３遺伝子のアミノ酸をＣからＷ（１７７位）に補正した。プライマーＹＬ５３１およびＹＬ５３２（配列番号３７４および３７５）を使用する以下の反応において、この変異誘発反応の生成物（すなわちｐＤＭＷ２８７／Ｙ５２９）をテンプレートとして使用して、アミノ酸をＰからＬ（２１３位）に補正した。この反応生成物をｐＤＭＷ２８７／ＹＬ５２９－３１と称した。
【０５１７】
遺伝子の第１および第２の四半分に対する突然変異と同時に、遺伝子の３’末端上で反応を同様に実施した。引き続く各変異誘発反応では、先行する反応からのプラスミド生成物を使用した。プライマーＹＬ５３３およびＹＬ５３４（配列番号３７６および３７７）をｐＤＭＷ２８７上で使用して、アミノ酸をＣからＳ（２４４位）に補正し、ｐＤＭＷ２８７／ＹＬ５３３を作り出した。プライマーＹＬ５３５およびＹＬ５３６（配列番号３７８および３７９）を使用して、ｐＤＭＷ２８７／ＹＬ５３３の合成Ｄ８Ｓ－３遺伝子中の

アミノ酸をＡからＴ（２８０位）に補正して、ｐＤＭＷ２８７／ＹＬ５３３－５を形成した。最後にｐＤＭＷ２８７／ＹＬ５３３－５をテンプレートとして、ＹＬ５３７およびＹＬ５３８（配列番号３８０および３８１）をプライマーとして使用して、合成Ｄ８Ｓ－３遺伝子中で３３３位のアミノ酸ＰをＳに補正した。得られたプラスミドをｐＤＭＷ２８７／ＹＬ５３３－５－７と命名した。

【０５１８】

ｐＤＭＷ２８７／ＹＬ５２９－３１のＢｇｌＩＩ／ＸｈｏＩ断片およびｐＤＭＷ２８７／ＹＬ５３３－５－７のＸｈｏＩ／ＮｏｔＩ断片を使用して、ｐＤＭＷ２８７／ＹＬ２５７のＢｇｌＩＩ／ＮｏｔＩ断片を変化させて、完全に補正された合成Δ８デサチュラーゼ遺伝子を含有するｐＤＭＷ２８７Ｆを生成し（図１３Ｃ）、Ｄ８ＳＦと命名して配列番号８１で記載した。配列番号８２は、配列番号８１のヌクレオチド２～１２７０によってコードされるアミノ酸配列を記載し、開始メチオニンに続いて追加的バリンがあること以外は、これは配列番号７８で記載される配列と本質的に同一である。

【０５１９】

実施例１０

ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）におけるコドン最適化Δ９エロンガーゼ遺伝子およびコドン最適化Δ８デサチュラーゼの機能性の発現

本実施例は、形質転換されて、実施例８および９からのコドン最適化Δ９エロンガーゼおよびコドン最適化Δ８デサチュラーゼを同時発現するヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）における、ＤＧＬＡ生合成および蓄積について述べる。これによってこの実験は、Δ９エロンガーゼ／Δ８デサチュラーゼ経路を発現する遺伝子の活性およびＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）の能力の双方を立証した。

【０５２０】

具体的にはコンストラクトｐＤＭＷ２８７ＦのキメラＦＢＡＩＮ：：Ｄ８ＳＦ：：Ｐｅｘ１６遺伝子を含んでなるＣｌａＩ／ＰａｃＩ断片（実施例９）をｐＤＭＷ２３７のＣｌａＩ／ＰａｃＩ部位に挿入し（実施例８）、コンストラクトｐＤＭＷ２９７（図１３Ｄ、配列番号１２３）を発生させた。

【０５２１】

プラスミドｐＤＭＷ２９７は、以下の構成要素を含有した。

【０５２２】

【表３５】

表25

プラスミドpDMW297（配列番号171）の説明

配列番号171内のRE部位およびヌクレオチド	断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明
EcoRI/ClaI（9053～10448）	ARS18配列（ジェンバンク登録番号A17608）
ClaI/*PacI*（1～2590）	以下を含んでなるFBAIN::D8SF::Pex16 ● FBAIN:FBAINプロモーター（配列番号214） ● D8SF:ミドリムシ由来コドン最適化Δ8デサチュラーゼ遺伝子（配列番号81）（ジェンバンク登録番号AF139720） ● Pex16:ヤロウィアPex16遺伝子のPex16ターミネーター配列（ジェンバンク登録番号U75433）
PacI/*SalI*（2590～4082）	ヤロウィアUra3遺伝子（ジェンバンク登録番号AJ306421）
SalI/BsiWI（4082～6257）	以下を含んでなるFBAIN::IgD9e::Pex20 ● FBAIN:FBAINプロモーター（配列番号214） ● IgD9e:イソクリシス・ガルバナ由来コドン最適化Δ9エロンガーゼ遺伝子（配列番号71）（ジェンバンク登録番号390174） ● Pex20:ヤロウィアPex20遺伝子のPex20ターミネーター配列（ジェンバンク登録番号AF054613）

【０５２３】

次に一般方法に従って、コンストラクトｐＤＭＷ２９７をＹ２０３１株（実施例７）の形質転換のために使用した。形質転換細胞をＭＭ選択培地プレート上に播種し、２～３日間３０℃に保った。ＭＭプレート上に生育した全部で８つの形質転換体を拾って、新鮮なＭＭプレート上に再度画線培養した。生育したらこれらの株を３０℃の液体ＭＭ中に個別に接種して、２５０ｒｐｍ／分で２日間振盪した。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換によって脂肪酸メチルエステルを調製し、引き続いてヒューレットパッカード（Ｈｅｗｌｅｔｔ－Ｐａｃｋａｒｄ）６８９０　ＧＣで分析した。

【０５２４】

ＧＣ分析は、ＤＧＬＡが分析した全ての形質転換体中で生成されたことを示した。１株は約３．２％を生成し、４株は４．３～４．５％を生成し、２株は５．５～５．８％を生成し、１株は６．４％のＤＧＬＡを生成した（ここで「Ｙ０４８９」株と命名した）。コドン最適化Ｙ０４８９株中のＤ８ＳＦ遺伝子の「パーセント（％）基質変換」は７５％と判定された。

【０５２５】

実施例１１

ω－６Δ９エロンガーゼ／Δ８デサチュラーゼ経路：ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）においてＤＨＡを生成する株の創生（予言的）

本実施例は、ω－６Δ９エロンガーゼ／Δ８デサチュラーゼ経路の発現を通じてＤＨＡを生成するように組換えヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＴＣＣ＃２０３６２由来株の構築について述べ、したがってこれらのＤＨＡ生成株の完全な脂質プロフィールの分析は、最終ＤＨＡ含有油におけるＧＬＡの同時合成を示唆しないであろうる。

【０５２６】

これらのＤＨＡ生成株の開発は、最初に、全脂質に対して９％のＥＰＡを生成できるヤ

ロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＴＣＣ＃２０３６２由来のＹ２２０１およびＹ２２０３株の創生を必要とした（図５）。株Ｙ２２０１およびＹ２２０３は、株Ｙ２１５２およびＹ２１５３（約３．５％のＤＧＬＡを生成する）、株Ｙ２１７３（１４％のＤＧＬＡを生成する）、および株Ｙ２１８９（５％のＥＰＡを生成する）の構築を必要とした。

【０５２７】

続いてＹ２２０１およびＹ２２０３はＬｙｓ－株であるために、当業者によく知られている方法を使用して、ｐＺＰ２ＦＯＥＮ４（配列番号１６５）のヌクレオチドの１２５８２～１１０９５位に及ぶヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）Ｕｒａ３遺伝子（ジェンバンク登録番号ＡＪ３０６４２１）とヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）Ｌｙｓ５遺伝子（ジェンバンク登録番号Ｍ３４９２９）とを交換して、プラスミドｐＺＰ２ＦＯＥＮ４－Ｌｙｓを作り出すことが必要であろう。この操作に続いて、実施例６で上述したようにして株Ｙ２２０１およびＹ２２０３をプラスミドｐＺＰ２ＦＯＥＮ４－Ｌｙｓで形質転換することにより、ω－６Δ９エロンガーゼ／Δ８デサチュラーゼ経路を使用してＤＨＡを生成する形質転換体株をもたらすことができる。

【０５２８】

全脂質の約３．５％のＤＧＬＡを生成するＹ２１５２およびＹ２１５３株の創出

コンストラクトｐＺＰ２Ｃ１６Ｍ８９９（図１４Ａ、配列番号１７２）を使用して、４個のキメラ遺伝子クラスター（２つのΔ９エロンガーゼ、合成$C_{16/18}$脂肪酸エロンガーゼ、およびΔ８デサチュラーゼを含んでなる）、ならびに単一アミノ酸突然変異を含有するヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）ＡＨＡＳ遺伝子（アセトヒドロキシ酸シンターゼ）を組み込んだ。ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）中の突然変異ＡＨＡＳ酵素は、スルホニル尿素抵抗性を与え、それを陽性スクリーニングマーカーとして使用した。プラスミドｐＺＰ２Ｃ１６Ｍ８９９は、ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）ＡＴＣＣ＃２０３６２株のＰｏｘ２遺伝子部位に組み込まれるようにデザインされたので、以下の構成要素を含有した。

【０５２９】

【表３６】

表26

プラスミドpZP2C16M899（配列番号172）の説明

配列番号172内のRE部位およびヌクレオチド	断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明
BsiWI/AscI（6152～6962）	ヤロウィアAco2遺伝子（ジェンバンク登録番号AJ001300）の810bpの5'部分
SphI/EcoRI（9670～10325）	ヤロウィアAco2遺伝子（ジェンバンク登録番号AJ001300）の655bpの3'部分
EcoRVがあるBsiWI/PmeI（929～3195）	以下を含んでなるGPM/FBAイントロン::rELO2S::Oct ● GPM/FBAIN:GPM::FBAINキメラプロモーター（配列番号219） ● rELO2S:ラット（ジェンバンク登録番号AB071986）由来コドン最適化rELO2エロンガーゼ遺伝子（配列番号85） ● OCT:ヤロウィアOCT遺伝子のOCTターミネーター配列（ジェンバンク登録番号X69988）
BsiWI/EcoRI（929～14447、逆転）	以下を含んでなるGPAT::IgD9e::Pex20 ● GPAT:GPATプロモーター（配列番号216） ● IgD9e:I.ガルバナ（galbana）由来コドン最適化Δ9エロンガーゼ遺伝子（配列番号71） ● Pex20:ヤロウィアPex20遺伝子のPex20ターミネーター配列（ジェンバンク登録番号AF054613）
EcoRI/SwaI（14447～12912）	以下を含んでなるTEF::IgD9e::Lip1 ● TEF:TEFプロモーター（ジェンバンク登録番号AF054508） ● IgD9e:配列番号71（前出） ● Lip1:ヤロウィアLip1遺伝子のLip1ターミネーター配列（ジェンバンク登録番号Z50020）
SwaI/PacI（12912～10325）	以下を含んでなるFBAIN::D8SF::Pex16 ● FBAIN:FBAINプロモーター（配列番号214） ● D8SF:ミドリムシ由来コドン最適化Δ8デサチュラーゼ遺伝子（配列番号81）（ジェンバンク登録番号AF139720） ● Pex16:ヤロウィアPex16遺伝子のPex16ターミネーター配列（ジェンバンク登録番号U75433）遺伝子
EcoRV/BsiWIがあるPmeI（3195～6152）	W497L突然変異を含んでなる*ヤロウィア・リポリティカ*AHAS遺伝子（配列番号243）

【０５３０】

プラスミドｐＺＰ２Ｃ１６Ｍ８９９をＳｐｈＩ／ＡｓｃＩで消化し、次に一般方法に従って使用してＡＴＣＣ＃２０３６２を形質転換した。形質転換に続いて細胞を１５０ｍｇのスルホニル尿素を含有するＭＭプレート上に播種し、３０℃に２～３日間保った。スルホニル尿素抵抗性コロニーを拾って、スルホニル尿素添加ＭＭ選択プレート上に画線培養した。次に全部で９６個の形質転換体をスルホニル尿素添加液体ＭＭ中に接種し、３０℃および２５０ｒｐｍ／分で２日間振盪した。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換によって脂肪酸メチルエステルを調製し、引き続いてヒューレットパッカード（Ｈｅｗｌｅｔｔ－Ｐａｃｋａｒｄ）６８９０　ＧＣで分析した。

【０５３１】

ＧＣ分析は、ｐＺＰ２Ｃ１６Ｍ８９９の４個のキメラ遺伝子を含有する形質転換体中に

ＤＧＬＡの存在を示したが、野性型ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）対照株中には示さなかった。選択された９６株のほとんどは、全脂質の２％未満のＤＧＬＡを生成した。全脂質の２～２．９％のＤＧＬＡを生成した２８株があった。全脂質の約３．５％のＤＧＬＡを生成した２株があった。株＃６５および＃７３をここで「Ｙ２１５２」および「Ｙ２１５３」株とそれぞれ命名した。

【０５３２】

全脂質の約１４～１６％のＤＧＬＡを生成するＹ２１７３およびＹ２１７５株の創出

コンストラクトｐＤＭＷ３１４（図１４Ｂ、配列番号１７３）を使用して、４個のキメラ遺伝子のクラスター（２つのΔ９エロンガーゼ、Δ８デサチュラーゼ、およびΔ１２デサチュラーゼを含んでなる）をヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）Ｙ２１５２およびＹ２１５３株のＵｒａ３遺伝子部位中に組み込み、それによってＤＧＬＡ生成を増強した。プラスミドｐＤＭＷ３１４は、以下の構成要素を含有した。

【０５３３】

【表３７】

表 27

プラスミド pDMW314（配列番号 173）の説明

配列番号173内のRE部位およびヌクレオチド	断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明
AscI/BsiWI（10066～9275）	*ヤロウィア*Ura3遺伝子（ジェンバンク登録番号AJ306421）の784bpの5’部分
SphI/PacI（12774～1）	*ヤロウィア*Ura3遺伝子（ジェンバンク登録番号AJ306421）の516bpの3’部分
SwaI/BsiWI（6582～9275）	以下を含んでなるFBAIN::F.D12S::Pex20 ● FBAIN：FBAINプロモーター（配列番号214） ● F.Δ12：*フザリウム・モニリフォルメ*Δ12デサチュラーゼ遺伝子（配列番号32） ● Pex20：*ヤロウィア*Pex20遺伝子のPex20ターミネーター配列（ジェンバンク登録番号AF054613）
ClaI/EcoRI（6199～4123）	pZP2C16M899（前出）について述べられるのと同様のGPAT::IgD9E::Pex20
EcoRI/SwaI（4123～2588）	pZP2C16M899（前出）について述べられるのと同様のTEF::IgD9E::Lip1
SwaI/PacI（2588～1）	pZP2C16M899（前出）について述べられるのと同様のFBAIN::D8SF::Pex16

【０５３４】

プラスミドｐＤＭＷ３１４をＡｓｃＩ／ＳｐｈＩで消化し、次に一般方法に従って使用してＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）Ｙ２１５２およびＹ２１５３株を形質転換した。形質転換細胞をＦＯＡ選択培地プレート上に播種し、３０℃に２～３日間保った。ＦＯＡ抵抗性コロニーを拾って、ＭＭおよびＭＭＵ選択プレート上に画線培養した。ＭＭＵプレート上で生育できるがＭＭプレート上では生育できないコロニーをＵｒａ－株として選択した。次にＵｒａ－株の単一コロニーを液体ＭＭＵ中に接種し、３０℃および２５０ｒｐｍ／分で２日間振盪した。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換によって脂肪酸メチルエステルを調製し、引き続いてヒューレットパッカード（Ｈｅｗｌｅｔｔ－Ｐａｃｋａｒｄ）６８９０　ＧＣで分析した。

【０５３５】

ＧＣ分析は、ｐＤＭＷ３１４の４つのキメラ遺伝子を含有するほとんど全ての形質転換

体において、ＤＧＬＡの生成増大を示した。４８個の選択されたｐＤＭＷ３１４によるＹ２１５２のＵｒａ－株のほとんどは、全脂質の約６～８％のＤＧＬＡを生成した。全脂質の約１３．９％のＤＧＬＡを生成した１株（すなわち＃４７、ここで「Ｙ２１７３」と命名される）があった。

【０５３６】

同様に、２４個の選択されたｐＤＭＷ３１４によるＹ２１５３のＵｒａ－株のほとんどは、全脂質の約６～８％のＤＧＬＡを生成した。全脂質の約１６．３％および１７．２％のＤＧＬＡをそれぞれ生成した２株があった（すなわち＃６および＃１１、ここで「Ｙ２１７５」および「Ｙ２１７６」株と命名される）。

【０５３７】

全脂質の約４．８％のＥＰＡを生成するＹ２１８９株の創出

コンストラクトｐＤＭＷ３２５（図１４Ｃ、配列番号１７４）を使用して、４個のキメラ遺伝子（２つのΔ５デサチュラーゼおよび２つのΔ１７デサチュラーゼを含んでなる）のクラスターをヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）Ｙ２１７３株のＬｅｕ２遺伝子部位中に組み込み、それによってＥＰＡの生成を可能にした。プラスミドｐＤＭＷ３２５は、以下の構成要素を含有した。

【０５３８】

【表３８】

表28

プラスミドpDMW325（配列番号174）の説明

配列番号174内のRE部位およびヌクレオチド	断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明
AscI/BsiWI（4837～5632）	ヤロウィアLeu2遺伝子（ジェンバンク登録番号AF260230）の788bpの5'部分
SphI/PacI（2137～1426）	ヤロウィアLeu2遺伝子（ジェンバンク登録番号AF260230）の703bpの3'部分
Pme/BsiWIがあるSwaI（8277～5632）	以下を含んでなるFBAIN::MAΔ5::Pex20 FBAIN：FBAINプロモーター（配列番号214） MAΔ5：*モルティエラ・アルピナ*Δ5デサチュラーゼ遺伝子（配列番号6）（ジェンバンク登録番号AF067654） Pex20：ヤロウィアのPex20遺伝子Pex20ターミネーター配列（ジェンバンク登録番号AF054613）
PmeIがあるEcoRI/SwaI（10876～8278）	以下を含んでなるGPM/FBAIN::I.Δ5S::Oct GPM/FBAIN：GPM::FBAINキメラプロモーター（配列番号219） I.Δ5S：イソクリシス・ガルバナ由来コドン最適化Δ5デサチュラーゼ遺伝子（配列番号10）（国際公開第2002/081668号パンフレット） OCT：ヤロウィアOCT遺伝子のOCTターミネーター配列（ジェンバンク登録番号X69988）
EcoRI/PmeI（10876～12497）	ヤロウィアUra3遺伝子（ジェンバンク登録番号AJ306421）
PmeI/ClaI（12497～14651）	以下を含んでなるYAT::D17S::Lip2 YAT：YAT1プロモーター（配列番号217） Δ17S：S.ディクリナ由来コドン最適化Δ17デサチュラーゼ遺伝子（配列番号21） Lip2：ヤロウィアリパーゼ2遺伝子のLip2ターミネーター（ジェンバンク登録番号AJ012632）
ClaI/PacI（14651～1426）	以下を含んでなるGPD::D17S::Pex16 GPD：GPDプロモーター（配列番号210） Δ17S：配列番号21（前出） Pex16：ヤロウィアPex16遺伝子のPex16ターミネーター配列（ジェンバンク登録番号U75433）

【０５３９】
プラスミドｐＤＭＷ３２５をＡｓｃＩ／ＳｐｈＩで消化し、次に一般方法に従って使用してＹ２１７３株を形質転換した。形質転換に続いて細胞をＭＭＬｅプレート上に播種して、３０℃に２～３日間保った。各形質転換からＭＭＬｅプレート上に生育した個々のコロニーを拾って、ＭＭおよびＭＭＬｅプレート上に画線培養した。ＭＭＬｅプレート上に生育できるが、ＭＭプレート上に生育できないコロニーをＬｅｕ２－株として選択した。次にＬｅｕ２－株の単一コロニーを液体ＭＭＬｅ培地中に接種して、３０℃および２５０ｒｐｍ／分で２日間振盪した。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換によって脂肪酸メチルエステルを調製し、引き続いてヒューレットパッカード（Ｈｅｗｌｅｔｔ－Ｐａｃｋａｒｄ）６８９０　ＧＣで分析した。

【０５４０】
ＧＣ分析は、ｐＤＭＷ３２５形質転換体中にＥＰＡの存在を示したが、親Ｙ２１７３株中には示さなかった。具体的には４８個の選択されたｐＤＭＷ３２５によるＹ２１７３のＬｅｕ２－形質転換体の内、ほとんどの株が全脂質の３％未満のＥＰＡを生成した。それぞれ全脂質の約４．８％および３．４％のＥＰＡを生成した２つの株（すなわち＃２１および＃４６、ここで「Ｙ２１８９」および「Ｙ２１９０」と命名される）があった。

【０５４１】
約９％のＥＰＡ全脂質を生成するＹ２２０１およびＹ２２０３株の創出
コンストラクトｐＺＫＳＬ５５９８（図１４Ｄ、配列番号１７５）を使用して、４個のキメラ遺伝子のクラスター（Δ９エロンガーゼ、Δ８デサチュラーゼ、および２つのΔ５デサチュラーゼを含んでなる）をヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）Ｙ２１８９株のＬｙｓ５遺伝子（ジェンバンク登録番号Ｍ３４９２９）部位に組み込み、それによってＥＰＡ生成を増強した。プラスミドｐＺＫＳＬ５５９８は、以下の構成要素を含有した。

【０５４２】

【表３９】

表 29
プラスミド pZKSL5598（配列番号 175）の説明

配列番号175内のRE部位およびヌクレオチド	断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明
AscI/BsiWI（10409～9573）	*ヤロウィア*Lys5遺伝子（ジェンバンク登録番号M34929）の794bpの5’部分
SphI/PacI（13804～13117）	*ヤロウィア*Lys5遺伝子（ジェンバンク登録番号M34929）の687bpの3’部分
BsiWI/SwaI（7150～9573）	以下を含んでなるNT::I.D5S::Lip1 ● NT:YAT1プロモーター（配列番号217） ● Δ5S:*イソクリシス・ガルバナ*由来コドン最適化Δ5デサチュラーゼ遺伝子（配列番号10）（国際公開第2002/081668号） ● Lip1:*ヤロウィア*Lip1遺伝子のLip1ターミネーター配列（ジェンバンク登録番号Z50020）
*Sal*I/BsiWI（4537～7150）	以下を含んでなるGPAT::MAΔ5::Pex20 ● GPAT:GPATプロモーター（配列番号216） ● MAΔ5:*モルティエラ・アルピナ*Δ5デサチュラーゼ遺伝子（配列番号6）（ジェンバンク登録番号AF067654） ● Pex20:*ヤロウィア*Pex20遺伝子からのPex20ターミネーター配列（ジェンバンク登録番号AF054613）
SwaI/PmeI（2381～348）	以下を含んでなるFBAINm::IgD9e::OCT ● FBAINm:FBAINmプロモーター（配列番号215） ● IgD9e:I.ガルバナ（galbana）由来コドン最適化Δ9エロンガーゼ遺伝子（配列番号71） ● OCT:*ヤロウィア*OCT遺伝子のOCTターミネーター配列（ジェンバンク登録番号X69988）
ClaI/PacI（1～13804）	以下を含んでなるGPD::D8SF::Pex16 ● GPD:GPDプロモーター（配列番号210） ● D8SF:*ミドリムシ*由来コドン最適化Δ8デサチュラーゼ遺伝子（配列番号81）（ジェンバンク登録番号AF139720） ● Pex16:*ヤロウィア*Pex16遺伝子のPex16ターミネーター配列（ジェンバンク登録番号U75433）
*Sal*I/PmeI（4537～2417）	*ヤロウィア*Leu2遺伝子（ジェンバンク登録番号AF260230）

【０５４３】

プラスミドｐＺＫＳＬ５５９８をＡｓｃＩ／ＳｐｈＩで消化し、次に一般方法に従って使用してＹ２１８９株を形質転換した。形質転換に続いて細胞をＭＭＬｙｓプレート上に播種して、３０℃に２～３日間保った。各形質転換からＭＭＬｙｓプレート上に生育した個々のコロニーを拾って、ＭＭおよびＭＭＬｙｓプレート上に画線培養した。ＭＭＬｙｓプレート上で生育できたが、ＭＭプレート上では生育できないコロニーをＬｙｓ－株として選択した。次にＬｙｓ－株の単一コロニーを液体ＭＭＬｙｓ培地中に接種して、３０℃および２５０ｒｐｍ／分で２日間振盪した。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換によって脂肪酸メチルエステルを調製し、引き続いてヒューレットパッカード（Ｈｅｗｌｅｔｔ－Ｐａｃｋａｒｄ）６８９０　ＧＣで分析した。

【０５４４】

ＧＣ分析は、ｐＺＫＳＬ５５９８形質転換体におけるＥＰＡの生成増大を示した。９６

個の選択されたｐＺＫＳＬ５５９８によるＹ２１８９のＬｙｓ－形質転換体の内、ほとんどの株は全脂質の４～８％のＥＰＡを生成した。全脂質の約９％および８．７％のＥＰＡをそれぞれ生成した２つの株（すなわち＃３４および＃７７、ここで「Ｙ２２０１」および「Ｙ２２０３と命名される」）があった。

【０５４５】

実施例１２

ω－３Δ９エロンガーゼ／Δ８デサチュラーゼ経路：ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）においてＤＨＡを生成する株の創生（予言的）

本実施例は、ω－３Δ９エロンガーゼ／Δ８デサチュラーゼ経路の発現を通じてＤＨＡを生成するように組換えヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＴＣＣ＃２０３６２由来株の構築について述べ、したがってこれらのＤＨＡ生成株の完全な脂質プロフィールの分析は、最終ＤＨＡ含有油におけるＧＬＡの同時合成を示唆しないでありうる。

【０５４６】

これらのＤＨＡ生成株の開発は、最初に、全脂質に対して１．３％のＥＰＡを生成できるヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＴＣＣ＃２０３６２由来のＬ１１６株の創生を必要とした（図５）。株Ｌ１１６は、株Ｌ９８（ＡＬＡを生成する）、株Ｌ１０３（増加したＡＬＡを生成する）、および株Ｌ１１５（約４％のＥＴＡを生成する）の構築を必要とした。さらに株Ｌ１１６は、ここでω－３特異性のみ（または強力なω－３特異性）を有することで特徴づけられるゼブラフィッシュ（Ｄａｎｉｏ　ｒｅｒｉｏ）（ジェンバンク登録番号ＢＣ０６８２２４）由来の新規二機能Δ５／Δ６デサチュラーゼの合成および発現を必要とした。

【０５４７】

続いてｐＫＵＴ１６によるＬ１１６中のＵｒａ３遺伝子の中断によってＬ１１６Ｕｒａ－株を生じることができ、次に実施例６で上述したようにして、Ｌ１１６Ｕｒａ－株をプラスミドｐＺＰ２ＦＯＥＮ４で形質転換することにより、ω－３Δ９エロンガーゼ／Δ８デサチュラーゼ経路を使用してＤＨＡを生成する形質転換体株をもたらすことができる。

【０５４８】

リサイクル可能な選択のためのＬｏｘＰ：：Ｕｒａ３／ＨＰＴ：：ＬｏｘＰ組み込みコンストラクトおよびＣｒｅ－ＳＵ複製型プラスミドの創生

ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中にΔ１５デサチュラーゼの複数コピーを導入するために利用されるストラテジーは、リサイクル可能な選択マーカーおよび部位特異的遺伝子組換えシステム（すなわちＣｒｅ／Ｌｏｘ）に依存する。簡単に述べると、標的遺伝子（すなわちフザリウム・モニリフォルメ（Ｆｕｓａｒｉｕｍ　ｍｏｎｉｌｉｆｏｒｍｅ）Δ１５デサチュラーゼ［配列番号５１］）は、組み込みコンストラクト中でＬｏｘ　Ｐ部位が側面に位置する選択マーカー（例えばＵｒａ３およびハイグロマイシンリン酸転移酵素［ＨＰＴ］）に隣接していた。形質転換および形質転換体の選択に続いて、スルホニル尿素抵抗性（ＳＵ）遺伝子およびＣｒｅリコンビナーゼ遺伝子を保有する複製型プラスミドの導入によって、選択マーカーを染色体から切除した。選択マーカー損失後、Ｃｒｅプラスミドをキュアリングした。このようにして入手されたキュアリング株は、別の形質転換の一巡のために使用できる。

【０５４９】

より具体的にはプラスミドｐＹ７２（図１５Ａ、配列番号１７６）は、１コピーのフザリウム・モニリフォルメ（Ｆｕｓａｒｉｕｍ　ｍｏｎｉｌｉｆｏｒｍｅ）Δ１５デサチュラーゼおよびＬｏｘ　Ｐ部位が側面に位置するＵｒａ３／ＨＰＴ選択マーカーを含んでなる、組み込みコンストラクトであった。コンストラクトｐＹ７２は以下の構成要素を含んだ。

【０５５０】

【表４０】

表 30
プラスミド pY72（配列番号 176）の説明

配列番号176内のRE部位およびヌクレオチド	断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明
6763～7643	*ヤロウィア*Lip1遺伝子（ジェンバンク登録番号Z50020）の881bpの5’部分
9422～10184	*ヤロウィア*Lip1遺伝子（ジェンバンク登録番号Z50020）の763bpの3’部分
SwaI/SbfI（16～2522）	以下を含んでなるFBAIN::FmD15:Lip2 ● FBAIN:FBAINプロモーター（配列番号214） ● FmD15:*フザリウム・モニリフォルメ*Δ15デサチュラーゼ遺伝子（配列番号51） ● Lip2:*ヤロウィア*Lip2遺伝子（ジェンバンク登録番号AJ012632）からのLip2ターミネーター配列
2531～2564	LoxP配列（配列番号382）
2566～4184	*ヤロウィア*Ura3遺伝子（ジェンバンク登録番号AJ306421）
4198～5861	以下を含んでなるTEF::HPT::XPR ● TEF:TEFプロモーター（ジェンバンク登録番号AF054508） ● HPT:ハイグロマイシン抵抗性を保有する大腸菌ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼコード領域（カスター（Kaster）,K.R.ら著、Nucleic Acids Res.11:6895～6911頁（1983年）） ● XPR:*ヤロウィア*Xpr遺伝子（ジェンバンク登録番号M17741）の約100bpの3’領域
5862～5895	LoxP配列（配列番号382）

【０５５１】

同様に、プラスミドｐＹ８０（図１５Ｂ、配列番号１７７）を使用して、２コピーのフザリウム・モニリフォルメ（Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｍｏｎｉｌｉｆｏｒｍｅ）Δ１５デサチュラーゼおよびＬｏｘ Ｐ部位が側面に位置するＵｒａ３／ＨＰＴ選択マーカーを含んでなる、組み込みコンストラクトを作り出した。プライマー４３６および４３７（配列番号３８３および３８４）を使用して、ＰＣＲを使用して、８８７８ｂｐのプラスミドｐＹ３４からのＧＰＤ：：Ｆｍ１：：ＸＰＲ２を含んでなるＰａｃＩ／ＦｓｅＩ断片を増幅した（国際公開第２００５／０４７４８０号パンフレット）。カリフォルニア州マウンテンビューのクローンテックラボラトリーズ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．（Ｍｏｕｎｔａｉｎ Ｖｉｅｗ，ＣＡ））からのインフュージョン（ｉｎ－ｆｕｓｉｏｎ）クローニングによって、ＰａｃＩ／ＦｓｅＩで消化したベクターｐＹ７２中にこのＰａｃＩ／ＦｓｅＩ断片をクローンし、メリーランド州ベセズダのＢＲＬ（ＢＲＬ（Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ））からのＸＬ－２ウルトラコンピテント細胞に形質転換した。ＰａｃＩ／ＦｓｅＩ消化に続いて、ミニプレップ分析によって同定された１０個の陽性形質転換体の内、クローン＃３および＃４のみが正確であった。正確なクローンの１つを「ｐＹ８０」と命名した。したがってコンストラクトｐＹ８０は以下の構成要素を含んだ。

【０５５２】

【表４１】

表31

プラスミドpY80（配列番号177）の説明

配列番号177内のRE部位およびヌクレオチド	断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明
PacI/FseI （4～2375）	以下を含んでなるGPD::FmD15:XPR ● GPD:GPDプロモーター（配列番号210） ● FmD15:*フザリウム・モニリフォルメ*Δ15デサチュラーゼ遺伝子（配列番号51） ● XPR:*ヤロウィア*Xpr遺伝子（ジェンバンク登録番号M17741）の約100bpの3’領域
FseI/SbfI 2385～4891	pY72（前出）について述べられるのと同様のFBAIN::FmD15:Lip2
4900～4933	LoxP配列（配列番号382）
4935～6533	*ヤロウィア*Ura3遺伝子（ジェンバンク登録番号AJ306421）
6567～8230	pY72（前出）について述べられるのと同様のTEF::HPT::XPR
8231～8264	LoxP配列（配列番号382）
8271～9079	*ヤロウィア*Lip1遺伝子（ジェンバンク登録番号Z50020）の809bpの5’部分
11791～12553	*ヤロウィア*Lip1遺伝子（ジェンバンク登録番号Z50020）の763bpの3’部分

【０５５３】

コンストラクトｐＹ７９（図１５Ｃ、配列番号１７８）は、スルホニル尿素抵抗性（ＳＵ）遺伝子（すなわちＡＨＡＳ）およびＴＥＦ：：Ｃｒｅリコンビナーゼ遺伝子を保有する複製型プラスミドであった。具体的には、コンストラクトｐＹ７９は、以下の構成要素を含有した。

【０５５４】

【表４２】

表32

プラスミドpY79（配列番号178）の説明

配列番号178内のRE部位およびヌクレオチド	断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明
4329～7315	W497L突然変異を含んでなる*ヤロウィア・リポリティカ*AHAS遺伝子（配列番号243）
7362～1	以下を含んでなるTEF::Cre::XPR ● TEF:TEFプロモーター（ジェンバンク登録番号AF054508） ● Cre:リコンビナーゼタンパク質の腸内細菌ファージP1 Cre遺伝子（ジェンバンク登録番号X03453） ● XPR:*ヤロウィア*Xpr遺伝子（ジェンバンク登録番号M17741）の約100bpの3’領域

【０５５５】

ＡＬＡを生成するＬ９８株の創出

プラスミドｐＹ７２（配列番号１７６）をＡｓｃＩ／ＳｐｈＩで消化し、次に標準酢酸

リチウム法を使用した野性型ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＴＣＣ＃２０３６２の形質転換のために使用した。形質転換に続いて細胞をＹＰＤ＋ハイグロマイシン（２５０μｇ／ｍＬ）プレート上に播種した。２日後、２０個の形質転換体を拾って新鮮なＹＰＤ＋ハイグロマイシン（２５０μｇ／ｍＬ）プレート上に画線培養し、３０℃で一晩インキュベートした。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換によって脂肪酸メチルエステルを調製し、引き続いてヒューレットパッカード（Ｈｅｗｌｅｔｔ－Ｐａｃｋａｒｄ）６８９０　ＧＣで分析した。

【０５５６】

ＧＣ分析はｐＹ７２形質転換体中にＡＬＡの存在を示したが、野性型ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）対照株中には示さなかった。最良クローンは全脂質の約２７％のＡＬＡを生成し、８０％の基質変換を示した。

【０５５７】

ＡＴＣＣ＃２０３６２／ｐＹ７２形質転換体をｐＹ７９（配列番号１７８、スルホニル尿素（ＳＵ）抵抗性マーカーを保有する）で形質転換し、ＭＭ＋ＳＵ（１５０μｇ／ｍＬ）プレート上で3日間にわたり形質転換体を選択して、ｐＹ７２中でＬｏｘＰ部位が側面に位置するＵｒａ３／ＨＰＴマーカーをゲノムから切除した。ＳＵ抵抗性（SU^R）形質転換体を新鮮なＭＭ＋ＳＵ（１５０μｇ／ｍＬ）プレート上で１日間、再度画線培養し、次にＹＰＤ＋ハイグロマイシン（２５０μｇ／ｍＬ）プレート上に複製播種した。（クローン＃１を除く）全てのクローンがハイグロマイシン感応性（Hyg^S）であり、ＨＰＴ抵抗性遺伝子がＣｒｅリコンビナーゼによって成功裏に切除されたことが示唆された。

【０５５８】

細胞をＹＰＤ中で選択なしに３０℃で一晩生育させて、Hyg^Sクローン＃６および＃１４からプラスミドｐＹ７９をキュアリングした。培養（０．１ｍＬ）を１ｍＬのＹＰＤに希釈して使用し、最高希釈２０，０００倍で連続希釈を作製した。次に各希釈を新しいＹＰＤプレート上に播種し、３０℃で一晩インキュベートした。プレートをＭＭ＋ＳＵ（１５０μｇ／ｍＬ）プレート上に複製播種した。全てのクローンがSU^S感応性であり、したがってそれらがｐＹ７９から成功裏にキュアリングされたことが示唆された。クローン＃６－１を追加的な形質転換のために使用した。

【０５５９】

具体的には上述の方法を使用して、プラスミドｐＹ８０（配列番号１７７）をＡｓｃＩ／ＳｐｈＩで消化し、次にそれを使用して株＃６－１を形質転換した。ＹＰＤ＋ハイグロマイシン（２５０μｇ／ｍＬ）プレート上での選択、全脂質のＧＣ分析、プラスミドｐＹ７９（配列番号１７８）での形質転換、SU^RおよびHyg^Sクローンの同定、およびプラスミドｐＹ７９のキュアリングに続いて、株＃１を同定した。したがってこの株は3コピーのＦｍΔ１５を保有し、ＬＡからＡＬＡへの基質変換は９６．１％であった。

【０５６０】

上述のようにして、株＃１をｐＹ８０で、引き続いてｐＹ７９で形質転換した。これは５コピーのＦｍΔ１５を有するＬ９８株の創生をもたらした。しかし不十分な基質（すなわちＬＡ）の結果として、この株におけるΔ１５不飽和化は、株＃１（３コピーのＦｍΔ１５を有する）と比べて顕著に改善されなかった。

【０５６１】

増大したＡＬＡを生成するＬ１０３株の創出

プラスミドｐＹ８６（図１５Ｄ、配列番号１７９）は、１コピーのフザリウム・モニリフォルメ（Ｆｕｓａｒｉｕｍ　ｍｏｎｉｌｉｆｏｒｍｅ）Δ１２デサチュラーゼおよびＬｏｘ　Ｐ部位が側面に位置するＵｒａ３／ＨＰＴ選択マーカーを含んでなる、組み込みコンストラクトであった。具体的にはｐＹ８６は、以下の構成要素を含有した。

【０５６２】

【表４３】

表33

プラスミドpY86（配列番号179）の説明

配列番号179内のRE部位およびヌクレオチド	断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明
3399～4207	*ヤロウィア*Lip1遺伝子（ジェンバンク登録番号Z50020）の809bpの5'部分
6919～7681	*ヤロウィア*Lip1遺伝子（ジェンバンク登録番号Z50020）の763bpの3'部分
28～61	LoxP配列（配列番号382）
63～1681	*ヤロウィア*Ura3遺伝子（ジェンバンク登録番号AJ306421）
1695～3358	以下を含んでなるTEF::HPT::XPR ● TEF:TEFプロモーター（ジェンバンク登録番号AF054508） ● HPT:ハイグロマイシン抵抗性を保有する大腸菌ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼコード領域（カスター（Kaster）, K.R.ら著、Nucleic Acids Res.11:6895～6911頁（1983年）） ● XPR: *ヤロウィア*Xpr遺伝子（ジェンバンク登録番号M17741）の約100bpの3'領域
3359～3392	LoxP配列（配列番号382）
PacI/FseI（7690～7）	以下を含んでなるFBAIN::FmD12::Lip2 ● FBAIN:FBAINプロモーター（配列番号214） ● FmD12: *フザリウム・モニリフォルメ*Δ12デサチュラーゼ遺伝子（配列番号32） ● Lip2: *ヤロウィア*Lip2遺伝子（ジェンバンク登録番号AJ012632）からのLip2ターミネーター配列

【０５６３】

上述の方法を使用して、プラスミドｐＹ８６をＡｓｃＩ／ＳｐｈＩで消化し、次にそれを使用してＬ９８株を形質転換した。ＹＰＤ＋ハイグロマイシン（２５０μｇ／ｍＬ）プレート上での選択、全脂質のＧＣ分析、プラスミドｐＹ７９（配列番号１７８）での形質転換、およびＳＵ^{R}およびＨｙｇ^{S}クローンの同定に続いて、Ｌ１０３株を同定した。したがってこの株は５コピーのＦｍΔ１５、１コピーのＦｍΔ１２およびを保有し、Ｕｒａ３－であった。Ｌ９８株と比べて、Ｌ１０３株中の１８：１の量（全脂肪酸の百分率として）は４２％から約１０％に低下し、Ｌ１０３株中の１８：２の量（全脂肪酸の百分率として）は２％から約１０％に増大し、Ｌ１０３株中のＡＬＡの量（全脂肪酸の百分率として）は２２％から約４７％に増大した。

【０５６４】

全脂質の約４％のＥＴＡを生成するＬ１１５株の創出

プラスミドｐＹ９４（図１６Ａ、配列番号１８０）は、１コピーのΔ８デサチュラーゼ、１コピーのΔ９エロンガーゼ、およびＬｏｘ　Ｐ部位が側面に位置するＵｒａ３選択マーカーを含んでなる組み込みコンストラクトであった。このプラスミドは以下の構成要素を含んだ。

【０５６５】

【表４４】

表 34
プラスミド pY94（配列番号 180）の説明

配列番号180内のRE部位およびヌクレオチド	断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明
PacI/SwaI（1～2587）	以下を含んでなるFBAIN::D8:Pex16 ● FBAIN:FBAINプロモーター（配列番号214） ● D8:*ミドリムシ*由来コドン最適化Δ8デサチュラーゼ遺伝子（配列番号81）（ジェンバンク登録番号AF139720） ● Pex16:*ヤロウィア*Pex16遺伝子（ジェンバンク登録番号U75433）のPex16ターミネーター配列
2592～4684	以下を含んでなるGPAT::D9E::Lip1 ● GPAT:GPATプロモーター（配列番号216） ● D9E:I.ガルバナ（galbana）由来コドン最適化Δ9エロンガーゼ遺伝子（配列番号71） ● Lip1:*ヤロウィア*Lip1遺伝子（ジェンバンク登録番号Z50020）のLip1ターミネーター配列
4714～「4747	LoxP配列（配列番号382）
4761～6378	*ヤロウィア*Ura3遺伝子（ジェンバンク登録番号AJ306421）
6380～6413	LoxP配列（配列番号382）
6470～7253	*ヤロウィア*Ura3遺伝子（ジェンバンク登録番号AJ306421）の784bpの5’部分
9965～10480	*ヤロウィア*Ura3遺伝子（ジェンバンク登録番号AJ306421）の516bpの3’部分

【０５６６】

標準酢酸リチウム法を使用してプラスミドｐＹ９４をＬ１０３株に形質転換した。形質転換に続いて細胞をＭＭプレート上に播種し、３日間保った。次に２２個のコロニーを拾って、新鮮なＭＭプレート上に画線培養し、３０℃で一晩生育させた。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換によって脂肪酸メチルエステルを調製し、引き続いてヒューレットパッカード（Ｈｅｗｌｅｔｔ－Ｐａｃｋａｒｄ）６８９０　ＧＣで分析した。クローン＃８（ここでＬ１０４株と命名される）は、最も高いΔ９エロンガーゼおよびΔ８デサチュラーゼ％基質変換を有した。

【０５６７】

Ｌ１０４株の対数期細胞を１μＬ（約０．５μｇ／μＬ）のｐＹ７９（配列番号１７８）で形質転換し、ＭＭＵ＋ＳＵ（１００μｇ／ｍＬ）プレート上で４日間にわたり形質転換体を選択して、ｐＹ９４中でＬｏｘＰ部位が側面に位置するＵｒａ３マーカーをゲノムから切除した。１２個のＳＵ^{R}形質転換体を２日間にわたり新鮮なＭＭおよびＭＭＵプレート上に再度画線培養した。（１個を除く）全てのクローンはＵＲＡ栄養要求性（すなわちＵｒａ^{S}）であり、したがってＣｒｅリコンビナーゼによってＵｒａ３抵抗性遺伝子が成功裏に切除されたことが示唆された。

【０５６８】

白金耳３分の１の細胞から、ＭＭＵ中で１：１０，０００～１：５０，０００倍の希釈を作製して、１個のＵＲＡ栄養要求株からプラスミドｐＹ７９をキュアリングした。希釈物（１００μＬ／プレート）をＹＰＤプレート上に播種し、３０℃で２日間インキュベートした。８個のコロニーをＹＰＤプレートから拾って、ＭＭＵプレートおよびＭＭＵ＋ＳＵプレート上に画線培養し、３０℃で２４時間インキュベートした。全てのクローンはＳ

Ｕ感応性（ＳＵ^{S}）であり、したがってそれらがｐＹ７９から成功裏にキュアリングされたことが示唆された。これらの１つをＬ１１１と命名し、したがってそれは５コピーのＦｍΔ１５、１コピーのＦｍΔ１２、１コピーのΔ８デサチュラーゼ、１コピーのΔ９エロンガーゼを保有するＵｒａ３－であった。

【０５６９】

上述の方法を使用して、Ｌ１１１株をｐＹ９４（配列番号１８０）で形質転換し、Ｌ１１５株（５コピーのＦｍΔ１５、１コピーのＦｍΔ１２、２コピーのΔ８デサチュラーゼ、２コピーのΔ９エロンガーゼを有し、Ｕｒａ３－として特徴づけられる）を作り出した。ＧＣ分析はＬ１１５株が全脂質の約４％ＥＴＡを生成したことを示した（完全な脂質プロフィール、下記）。

【０５７０】

全脂質の約１．３％のＥＰＡを生成するＬ１１６株の創出

ジェンバンク登録番号ＡＦ３０９５５６として同定されたゼブラフィッシュ（Ｄａｎｉｏ　ｒｅｒｉｏ）デサチュラーゼ（ヘースティングス（Ｈａｓｔｉｎｇｓ）ら著、ＰＮＡＳ９８（２５）：１４３０４～１４３０９（２００１年））は、サッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中で、（１）ω－６基質と比べて明確なω－３基質に対する好み、および（２）Δ５デサチュラーゼ活性と比べてわずかにより高いΔ６デサチュラーゼ活性がある、Δ６およびΔ５デサチュラーゼ活性の二機能を示すことが報告された。

【０５７１】

本出願人らは、ジェンバンク登録番号ＢＣ０６８２２４をＯＲＦの９８４位における１ｂｐ（Ｔ）欠失（ヌル突然変異をもたらす）および１１７１位における１ｂｐ分だけ変化（「Ｇ」から「Ａ」、「Ｖ」から「Ｍ」へのアミノ酸変化をもたらす）が異なるジェンバンク登録番号ＡＦ３０９５５６の相同体として同定した。

【０５７２】

次にＶ１１７１Ｍ突然変異以外は、ジェンバンク登録番号ＡＦ３０９５５６（ここで「Ｄｒｄ６／ｄ５（Ｖ）」として同定される、配列番号１５）と同一の突然変異タンパク質（ここで「Ｄｒｄ６／ｄ５（Ｍ）」として同定される、配列番号１８）を作り出した。具体的にはプライマー対４７５および４７７（配列番号３８５および３８６）および４７８および４７６（配列番号３８７および３８８）［ここでプライマー４７７および４７８は、「欠損したＴ」を有する］を使用して、ジェンバンク登録番号ＢＣ０６８２２４　ｃＤＮＡファージミドから２つの重複断片を最初に増幅した。次にプライマー４７５および４７６、およびテンプレートとして２つの重複断片を使用して、Ｄｒｄ６／ｄ５（Ｍ）ＯＲＦ全体を増幅した。以下の構成要素を含有し、ここでプラスミド「ｐＹ９１Ｍ」として同定される複製型プラスミドにＯＲＦを入れた（図１６Ｂ）。

【０５７３】

【表４５】

表 35
プラスミド pY91M（配列番号 181）の説明

配列番号181内のRE部位およびヌクレオチド	断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明
2866～4170	ARS18配列（ジェンバンク登録番号A17608）
4216～5703	*ヤロウィア*Ura3遺伝子（ジェンバンク登録番号AJ306421）
Sall/BsiwI（5705～8423）	以下を含んでなるFBAIN::DrD6:Pex20 ● FBAIN:FBAINプロモーター（配列番号214） ● DrD6:ゼブラフィッシュΔ5/Δ6デサチュラーゼ由来Drd6/d5（M）遺伝子（配列番号17）（ジェンバンク登録番号BC068224） ● Pex20:*ヤロウィア*Pex20遺伝子（ジェンバンク登録番号AF054613）のPex20ターミネーター配列

【０５７４】

ストラタジーン（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）からのクイックチェンジ（ＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ）（登録商標）ＩＩ部位特異的変異誘発キット（カタログ番号２００５２３）およびプライマー５０５および５０６（配列番号３８９および３９０）を使用して、部位特異的変異誘発によって、プラスミドｐＹ９１ＭからプラスミドｐＹ９１Ｖを作り出した。上述のＭからＶへのアミノ酸突然変異をもたらした単一ｂｐ変化以外は、ｐＹ９１ＶはｐＹ９１Ｍと同一であった。

【０５７５】

標準酢酸リチウム法を使用して、プラスミドｐＹ９１ＭおよびｐＹ９１Ｖ、ならびに対照の役割をする空ベクターをそれぞれＬ１１５株の対数期細胞に形質転換した。形質転換に続いて細胞をＭＭプレート上に播種し、３日間保った。次にコロニーを拾って新鮮なＭＭプレート上に画線培養し、３０℃で一晩生育させた。各クローンから白金耳３分の１の細胞を３ｍＬのＭＭ中に接種して、振盪機内で３０℃で２４時間生育させた。代案としては細胞をＭＭ中で２４時間生育させ、次にＨＧＭ中で３日間培養した。全細胞を採取して、前述のようにそれらの脂肪酸組成物をＧＣによって分析した。

【０５７６】

空ベクター（対照）、ｐＹ９１Ｍ、およびｐＹ９１Ｖで形質転換されたＬ１１５株（ω－３Δ９エロンガーゼ／Δ８デサチュラーゼ経路の結果としてＦｍΔ１５、ＦｍΔ１２、Δ８デサチュラーゼ、およびΔ９エロンガーゼキメラ遺伝子を発現する）の完全な脂質プロフィールを下の表３６に示す。脂肪酸は１６：０、１６：１、１７：１、１８：０、１８：１（オレイン酸）、１８：２（ＬＡ）、ＧＬＡ、２０：２（ＥＤＡ）、ＤＧＬＡ、ＡＲＡ、ＡＬＡ、ＳＴＡ、２０：３（ＥＴｒＡ）、ＥＴＡ、およびＥＰＡとして同定され、それぞれの組成は全脂肪酸の％として表される。「実験番号」と題された欄で実験番号１、２、および３として同定される、３つの別個の実験を実施した。さらにω－６およびω－３基質の双方を使用した活性に関する、各株のΔ６およびΔ５の％基質変換を報告する（表３７）。

【０５７７】

表36

pY91MおよびpY91Vで形質転換した*ヤロウィア・リポリティカ*L115株の脂質プロフィール

実験番号	株	時間/培地	16:0%	16:1%	18:0%	18:1%	18:2%	GLA%	20:2%	DGLA%	ARA%	ALA%	STA%	20:3%	ETA%	EPA%
1	L115+pY91M(クローン11)	1D MM	16	10	2	8	11	0.0	0	1	0.0	40	3.2	1.1	4.2	1.3
1	L115+対照	1D MM	18	9	5	18	12	0.0	0	1	0.0	31	0.0	0.9	3.9	0.0
2	L115+pY91M(クローン11)	1D MM/ 3D HGM	14	11	6	26	15	0.5	1	2	0.0	18	2.4	1.0	2.9	0.6
2	L115+対照	1D MM/ 3D HGM	13	11	6	26	15	0.2	1	2	0.0	20	0.0	1.5	4.1	0.2
3	L115+pY91V(クローン10)	1D MM	17	8	6	20	15	0.0	0	1	0.0	27	0.0	0.9	3.9	0.0
3	L115+pY91M(クローン11)	1D MM	17	9	3	11	11	0.0	0	0	0.0	38	2.6	1.1	4.4	1.2
3	L115+対照	1D MM	17	8	6	21	13	0.0	0	1	0.0	28	0.0	1.1	4.0	0.0

* クローン#11として同定されるL115/pY91M形質転換体を*ヤロウィア・リポリティカ*「L116」株と命名した

【表４７】

表37
Drd6/d5MおよびDrd6/d5Vによる基質転換百分率

実験番号	株	ω-3/ω-6	Δ6(ω-6)	Δ6(ω-3)	Δ5(ω-6)	Δ5(ω-3)
1	L115+pY91M(クローン11)	4.2	0	7	0	23
1	L115+対照	2.8	0	0	0	0
2	L115+pY91M(クローン11)	1.3	3	12	0	16
2	L115+対照	1.5	1	0	0	5
3	L115+pY91V(クローン10)	2.0	0	0	0	0
3	L115+pY91M(クローン11)	4.4	0	7		21
3	L115+対照	2.5	0	0	0	0

【０５７９】

上の結果で実証されるように、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）におけるＤｒｄ６／ｄ５（Ｍ）の発現（すなわちＬ１１５株＋ｐＹ９１Ｍ）からは、Δ６デサチュラーゼ活性（すなわちＡＬＡからＳＴＡ）よりもΔ５デサチュラーゼ活性（すなわちＥＴＡからＥＰＡ）の方が％基質変換が高く、Δ６およびΔ５デサチュラーゼ活性のどちらもω－３基質に対する好みがはるかにより高い、Δ６およびΔ５デサチュラーゼ活性の双方を有する二機能酵素が確かに生じた。意外にもＤｒｄ６／ｄ５（Ｖ）（すなわちＬ１１５株＋ｐＹ９１Ｖ）は、ω－６基質に対するΔ６またはΔ５活性を示さなかったのに対し、Ｄｒｄ６／ｄ５（Ｍ）はω－６基質に対するΔ５活性を欠いてきた。したがってＤｒｄ６／ｄ５（Ｍ）は、Ｄｒｄ６／ｄ５（Ｖ）とは異なる特性を有した。公開された研究とのＤｒｄ６／ｄ５（Ｖ）活性の違いは、おそらくその中でタンパク質が発現した異なる宿主生物および／または基質の起源（すなわち基質供給［ヘースティングス（Ｈａｓｔｉｎｇｓ）ら、前出］または基質生合成［ここで実証される］）に関係

があると思われる。

【０５８０】

Ｄｒｄ６／ｄ５（Ｍ）およびＤｒｄ６／ｄ５（Ｖ）の基質特異性をより良く理解するために、ＦＢＡＩＮ：：Ｄｒｄ６／ｄ５（Ｍ）：：Ｐｅｘ２０およびＦＢＡＩＮ：：Ｄｒｄ６／ｄ５（Ｖ）：：Ｐｅｘ２０キメラ遺伝子をＬＥＵ選択があるヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）複製型プラスミド中に転移し、それによってプラスミドｐＹ１０２（Ｍ）およびｐＹ１０２（Ｖ）の創生をそれぞれもたらした。次にこれらのプラスミドをΔ１２デサチュラーゼノックアウトを含んでなるＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）株であるＱ－ｄ１２Ｄ株に形質転換した（国際公開第２００４／１０４１６７号パンフレット）。形質転換体を０．５ｍＭのＬＡ、ＡＬＡ、ＥＴｒＡ［２０：３（１１，１４，１７）］、ＥＤＡ、ＤＧＬＡまたはＥＴＡのいずれかの存在下で、ＭＭ中で１日間生育させて％基質転換を試験した。結果を下の表３８に示す。

【０５８１】

【表４８】

表38

形質転換体 *ヤロウィア*Q-d12D株におけるDrd6/d5(M)およびDrd6/d5(V)による基質転換百分率

プラスミド	脂肪酸	基質転換(%)					
		Δ6 (ω-6)	Δ6 (ω-3)	Δ8 (ω-6)	Δ8 (ω-3)	Δ5 (ω-6)	Δ5 (ω-3)
pY102(M)	LA	**17**	-	-	-	-	-
pY102(V)	LA	**4**	-	-	-	-	-
pY102(M)	ALA	-	**24**	-	-	-	-
pY102(V)	ALA	-	**6**	-	-	-	-
pY102(M)	EDA	17	-	**0**	-	-	-
pY102(V)	EDA	0	-	**0**	-	-	-
pY102(M)	ETrA	-	30	-	**13**	-	-
pY102(V)	ETrA	-	9	-	**0**	-	-
pY102(M)	DGLA	-	-	-	-	**12**	-
pY102(V)	DGLA	-	-	-	-	**0**	-
pY102(M)	ETA	-	-	-	-	-	**34**
pY102(V)	ETA	-	-	-	-	-	**0**

【０５８２】

結果は、新規Ｄｒｄ６／ｄ５（Ｍ）デサチュラーゼが、（公開されたＤｒｄ６／ｄ５（Ｖ）デサチュラーゼと比べて）以下を有することを示した。（１）試験された全基質に対するより高い％基質変換、（２）ω－６脂肪酸と比べてω－３脂肪酸に対するより高い選択性［しかしＤｒｄ６／ｄ５（Ｖ）中にはω－３またはω－６基質のどちらについてもΔ５活性はなかった］、および（３）予想外のΔ８デサチュラーゼ活性。

【０５８３】

Ｑ－ｄ１２Ｄ形質転換体とＬ１１５形質転換体との％基質転換の違いは、おそらく基質供給の結果であった。Ｄｒｄ６／ｄ５はアシル－ＣｏＡ基質に作用することが報告されているので、デサチュラーゼ活性は、脂肪酸供給、またはヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）宿主による新規（ｄｅ　ｎｏｖｏ）合成の結果として異なることができる。別の予想外の観察は、Ｄｒｄ６／ｄ５（Ｍ）がＥＴｒＡ［２０：３（１１，１４，１７）］をＥＴＡに

変換したが、ＥＤＡ［２０：２（１１，１４）］をＤＧＬＡに変換しなかったことであり、すなわちタンパク質はω－３基質に対してのみΔ８デサチュラーゼ活性を有した。

【０５８４】

この新規なＤｒｄ６／ｄ５（Ｍ）デサチュラーゼは、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中で発現させると、経路エンジニアリングのためにユニークな利点を提供できる特性を有することが考察される。

【０５８５】

実施例１３

全脂質の１４％のＥＰＡを生成する間性Ｙ２０６７Ｕ株の創生

本実施例は、全脂質に対して１４％のＥＰＡを生成できるヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＴＣＣ＃２０３６２由来のＹ２０６７Ｕ株の構築について述べる（図５）。この株を改変してω-６Δ６デサチュラーゼ／Δ６エロンガーゼ経路を発現した。実施例１７、１８、１９、および２４（下記）でそれぞれ記述されるようにして、ＴＡＧ含有量および／または組成の分析に基づいて、Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＬＰＡＡＴ２、ＤＧＡＴ１、およびＤＧＡＴ２、およびＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＣＰＴ１遺伝子の過剰発現の効果をこのＥＰＡ生成株で調べた。

【０５８６】

Ｙ２０６７Ｕ株の開発は、Ｍ４株（８％のＤＧＬＡ生成し、実施例６で記述される）、Ｙ２０３４株（１０％のＡＲＡを生成する）、Ｅ株（１０％のＥＰＡを生成する）、ＥＵ株（１０％のＥＰＡを生成する）、および株Ｙ２０６７（１５％のＥＰＡを生成する）の構築を必要とした。

【０５８７】

全脂質の約１０％のＡＲＡを生成するＹ２０３４株の創生

コンストラクトｐＤＭＷ２３２（図１６Ｃ、配列番号１８２）を生じさせ、２つのΔ５キメラ遺伝子をヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）Ｍ４株のＬｅｕ２遺伝子に組み込んだ。プラスミドｐＤＭＷ２３２は、表３９で記述される以下の構成要素を含有した。

【０５８８】

【表４９】

表39

プラスミドpDMW232（配列番号182）の説明

配列番号182内のRE部位およびヌクレオチド	断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明
AscI/BsiWI（5550～4755）	ヤロウィアLeu2遺伝子（ジェンバンク登録番号AF260230）の788bpの5'部分
SphI/PacI（8258～8967）	ヤロウィアLeu2遺伝子（ジェンバンク登録番号AF260230）の703bpの3'部分
SwaI/BsiWI（2114～4755）	以下を含んでなるFBAIN::MAΔ5::Pex20 ● FBAIN:FBAINプロモーター（配列番号214） ● MAΔ5:*モルティエラ・アルピナ*Δ5デサチュラーゼ遺伝子（配列番号6）（ジェンバンク登録番号AF067654） ● Pex20:ヤロウィアPex20遺伝子のPex20ターミネーター配列（ジェンバンク登録番号AF054613）
SwaI/ClaI（2114～17）	以下を含んでなるTEF::MAΔ5::Lip1 ● TEF:TEFプロモーター（ジェンバンク登録番号AF054508） ● MAΔ5:配列番号6（前出） ● Lip1:ヤロウィアLip1遺伝子のLip1ターミネーター配列（ジェンバンク登録番号Z50020）
PmeI/ClaI（5550～4755）	ヤロウィアUra3遺伝子（ジェンバンク登録番号AJ306421）

【０５８９】

プラスミドｐＤＭＷ２３２をＡｓｃＩ／ＳｐｈＩで消化し、次に一般方法に従って使用さしてＭ４株を形質転換した。形質転換に続いて細胞をＭＭＬｅプレート上に播種し、３０℃に２～３日間保った。各形質転換からＭＭＬｅプレート上に生育した個々のコロニーを拾って、ＭＭおよびＭＭＬｅプレート上に画線培養した。ＭＭＬｅプレート上で生育できるが、ＭＭプレート上では生育できないコロニーをＬｅｕ２－株として選択した。次にＬｅｕ２－株の単一コロニーを３０℃の液体ＭＭＬｅ培地中に接種して、２５０ｒｐｍ／分で２日間振盪した。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換によって脂肪酸メチルエステルを調製し、引き続いてヒューレットパッカード（Ｈｅｗｌｅｔｔ－Ｐａｃｋａｒｄ）６８９０　ＧＣで分析した。

【０５９０】

ＧＣ分析は、ｐＤＭＷ２３２形質転換体中のＡＲＡの存在を示したが、親Ｍ４株中には示さなかった。具体的には４８個の選択されたｐＤＭＷ２３２によるＬｅｕ２－形質転換体中に、組換えヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）中の全脂質の５％未満のＡＲＡを生成した３４株、６～８％のＡＲＡを生成した１１株、および約１０％のＡＲＡを生成した３株があった。１０％のＡＲＡを生成した株の１つを「Ｙ２０３４」と命名した。

【０５９１】

全脂質の約１０％のＥＰＡを生成するＥ株の創生

プラスミドｐＺＰ３Ｌ３７（実施例６）をＡｓｃＩ／ＳｐｈＩ、で消化し、次に一般方法に従って使用してＹ２０３４株を形質転換した。形質転換に続いて、細胞をＭＭプレート上に播種して、３０℃に２～３日間保った。ＭＭプレート上に生育した全部で４８個の形質転換体を拾って、新鮮なＭＭプレート上に再度画線培養した。生育したらこれらの株を液体ＭＭ中に個々に接種して、３０℃および２５０ｒｐｍ／分で２日間振盪した。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換によって脂肪酸メチルエステルを調製し、引き続いてヒューレットパッカード（Ｈｅｗｌｅｔｔ－Ｐａｃｋａｒｄ）６８９０　ＧＣで分析した。

【０５９２】

ＧＣ分析は、ｐＺＰ３Ｌ３７による形質転換体のほとんどにおいてＥＰＡの存在を示したが、親株（すなわちＹ２０３４）中には示さなかった。ｐＺＰ３Ｌ３７による４８個の選択された形質転換体中に、組換えヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）中の全脂質の２％未満のＥＰＡを生成した１８株、２～３％のＥＰＡを生成した１４株、および約７％のＥＰＡを生成した１株があった。

【０５９３】

一般方法で記述されるようにして、「二段階生育条件」（すなわち４８時間のＭＭ、７２時間のＨＧＭ）を使用して株を培養した後、７％のＥＰＡを生成した株をさらに分析した。ＧＣ分析は、組換え株が二段階生育後に全脂質の約１０％のＥＰＡを生成したことを示した。株を「Ｅ」株と命名しれた。

【０５９４】

Ｕｒａ－表現型による全脂質の約１０％のＥＰＡを生成するＥＵ株の創生

５－ＦＯＡ抵抗性であるＥ株の突然変異細胞を同定して、ＥＵ株（Ｕｒａ$^{-}$）を作り出した。具体的には白金耳１つ分のヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）Ｅ株細胞を３ｍＬのＹＰＤ培地中に接種して、２５０ｒｐｍで振盪しながら３０℃で２４時間生育させた。培養物をＹＰＤでOD_{600}０．４に希釈し、次にさらに４時間インキュベートした。培養をＭＭ＋ＦＯＡプレート上に播種して（１００μｌ／プレート）、３０℃に２～３日間保った。全部で１６個ＦＯＡ抵抗性コロニーを拾って、ＭＭおよびＭＭ＋ＦＯＡ選択プレート上に画線培養した。これらからＦＯＡ選択プレート上に生育するが、ＭＭプレート上では生育できない１０個のコロニーを有望なＵｒａ$^{-}$株として選択した。

【０５９５】

これらの株の１つをキメラＧＰＤ：：フザリウム・モニリフォルメ（Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｍｏｎｉｌｉｆｏｒｍｅ）Δ１５：：ＸＰＲ２遺伝子、および選択マーカーとしてＵｒａ３遺伝子（図１６Ｄ、配列番号１８３）を含んでなる、ｐＹ３７／Ｆ１５による形質転換のための宿主として使用した。ＭＭプレート上での３日間の選択後、数百のコロニーがプレート上に生育し、プラスミドを保有しない形質転換対照のコロニー生育はなかった。この実験で５－ＦＯＡ抵抗性宿主株がＵｒａ－であることが確認され、この株を「ＥＵ」株と命名した。

【０５９６】

次にＥＵ株の単一コロニーを０．１ｇ／Ｌのウリジンをさらに含有する液体ＭＭＵ中に接種して、２５０ｒｐｍ／分で振盪して３０℃で２日間培養した。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換によって脂肪酸メチルエステルを調製し、引き続いてヒューレットパッカード（Ｈｅｗｌｅｔｔ－Ｐａｃｋａｒｄ）６８９０　ＧＣで分析した。ＧＣ分析は、ＥＵ株が全脂質の約１０％のＥＰＡを生成したことを示した。

【０５９７】

全脂質の約１５％のＥＰＡを生成するＹ２０６７株の創生

プラスミドｐＫＯ２ＵＦ２ＰＥ（図１７Ａ、配列番号１８４）を作り出して、２つのキメラ遺伝子（異種のΔ１２デサチュラーゼおよび$C_{18/20}$エロンガーゼを含んでなる）を含有するクラスターおよびＵｒａ３遺伝子をＥＵ株の天然ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）Δ１２デサチュラーゼ遺伝子に組み込んだ。プラスミドｐＫＯ２ＵＦ２ＰＥは、以下の構成要素を含有した。

【０５９８】

【表５０】

表40

プラスミドpKO2UF2PE（配列番号184）の説明

配列番号184内のRE部位およびヌクレオチド	断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明
AscI/BsiWI（3382～2645）	ヤロウィアΔ12デサチュラーゼ遺伝子（配列番号28）の730bpの5'部分
SphI/EcoRI（6090～6646）	ヤロウィアΔ12デサチュラーゼ遺伝子（配列番号28）の556bpの3'部分
SwaI/BsiWI/（1～2645）	以下を含んでなるFBAINm::F.Δ12DS::Pex20 ● FBAINm:FBAINmプロモーター（配列番号215） ● F.Δ12:フザリウム・モニリフォルメΔ12デサチュラーゼ遺伝子（配列番号32） ● Pex20:ヤロウィアPex20遺伝子のPex20ターミネーター配列（ジェンバンク登録番号AF054613）
SwaI/PmeI（1～8525）	以下を含んでなるGPAT::EL1S::OCT ● GPAT:GPATプロモーター（配列番号216） ● EL1S:*モルティエラ・アルピナ*由来コドン最適化エロンガーゼ1遺伝子（配列番号24）（ジェンバンク登録番号AX464731） ● OCT:ヤロウィアOCT遺伝子のOCTターミネーター配列（ジェンバンク登録番号X69988）
EcoRI/PacI（6646～8163）	ヤロウィアUra3遺伝子（ジェンバンク登録番号AJ306421）

【０５９９】

プラスミドｐＫＯ２ＵＦ２ＰＥをＡｓｃＩ／ＳｐｈＩで消化し、次に一般方法に従って使用してＥＵ株を形質転換した（ただし形質転換緩衝液への懸濁に先だってＥＵ株をＹＰＤプレート上に画線培養しておよそ３６時間［１８時間に対して］生育させた）。形質転換に続いて細胞をＭＭプレート上に播種し、３０℃に２～３日間保った。ＭＭプレート上に生育した全部で７２個の形質転換体を拾って、新鮮なＭＭプレート上に別々に再度画線培養した。生育したらこれらの株を３０℃の液体ＭＭ中に個々に接種して、２５０ｒｐｍ／分で２日間振盪した。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換によって脂肪酸メチルエステルを調製し、引き続いてヒューレットパッカード（Ｈｅｗｌｅｔｔ－Ｐａｃｋａｒｄ）６８９０　ＧＣで分析した。

【０６００】

ＧＣ分析は、ほとんど全てのｐＫＯ２ＵＦ２ＰＥによる形質転換体中にＥＰＡの存在を示した。より具体的には、７２個の選択された形質転換体中に、組換えヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）中の全脂質の８～９．９％のＥＰＡを生成した１７株、１０～１０．９％のＥＰＡを生成した２７株、１１～１１．９％のＥＰＡを生成した１６株、および１２～１２．７％のＥＰＡを生成した７株があった。１２．７％のＥＰＡを生成した株を一般方法で記述されるようにして、二段階生育条件（すなわち４８時間のＭＭ、７２時間のＨＧＭ）を使用してさらに分析した。ＧＣ分析は、組換え株が全二段階生育後に脂質の約１５％のＥＰＡを生成したことを示した。本株を「Ｙ２０６７株」と命名した。

【０６０１】

Ｕｒａ－表現型による全脂質の約１４％のＥＰＡを生成するＹ２０６７Ｕ株の創生

プラスミドｐＺＫＵＴ１６（実施例６）をＳａｌＩ／ＰａｃＩで消化し、次に一般方法に従って使用してＹ２０６７株を形質転換した。形質転換に続いて細胞をＭＭ＋５－ＦＯＡ選択プレート上に播種し、３０℃に２～３日間保った。

【０６０２】

ＭＭ＋５－ＦＯＡプレート上に生育した全部で２４形質転換体を拾って、ＭＭプレートおよびＭＭ＋５－ＦＯＡプレート上に別々に再度画線培養した。ＭＭ＋５－ＦＯＡプレー

ト上で生育できるが、ＭＭプレート上では生育できない株をＵｒａ－株として選択した。全部で１０個のＵｒａ－株を３０℃の液体ＭＭＵ培地中に個々に接種し、２５０ｒｐｍ／分で振盪して１日間生育させた。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換によって脂肪酸メチルエステルを調製し、引き続いてヒューレットパッカード（Ｈｅｗｌｅｔｔ－Ｐａｃｋａｒｄ）６８９０　ＧＣで分析した。

【０６０３】

ＧＣ分析は、ＭＭＵ培地中で１日間の生育後に、ｐＺＫＵＴ１６による全形質転換体中に５～７％のＥＰＡの存在を示した。６．２％のＥＰＡを生成した株を二段階生育条件（すなわち４８時間のＭＭ、９６時間のＨＧＭ）を使用してさらに分析した。ＧＣ分析は、組換え株が全脂質の約１４％のＥＰＡを生成したことを示した。株を「Ｙ２０６７Ｕ」株と命名した。

【０６０４】

野生型ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＴＣＣ＃２０３６２に対するこの株の最終遺伝子型は、次のとおりであった。Ｕｒａ３－、Ｐｏｘ３－、Ｙ．Δ１２－、ＦＢＡ：：Ｆ．Δ１２：：Ｌｉｐ２、ＦＢＡＩＮｍ：：Ｆ．Δ１２：：Ｐｅｘ２０、ＴＥＦ：：Δ６Ｓ：：Ｌｉｐ１、ＦＢＡＩＮ：：Ｅ１Ｓ：：Ｐｅｘ２０、ＧＰＡＴ：：Ｅ１Ｓ：：Ｏｃｔ、ＴＥＦ：：Ｅ２Ｓ：：Ｘｐｒ、ＦＢＡＩＮ：：Δ５：：Ｐｅｘ２０、ＴＥＦ：：Δ５：：Ｌｉｐ１、ＦＢＡＩＮ：：Δ１７Ｓ：：Ｌｉｐ２、ＦＢＡＩＮｍ：：Δ１７Ｓ：：Ｐｅｘ１６、ＴＥＦ：：Δ１７Ｓ、およびＴＥＦ：：ｒＥＬＯ２Ｓ：：Ｐｅｘ２０。

【０６０５】

実施例１４

全脂質の１６％のＥＰＡを生成する間性Ｙ２１０７Ｕ１株の創生

本実施例は、全脂質に比べて顕著な濃度のＥＰＡ生成できるヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＴＣＣ＃２０３６２由来のＹ２１０７Ｕ１株の構築について述べる（図５）。実施例２０（下記）で記述されるようにして、ＴＡＧ含有量および／または組成の分析に基づいて、このＥＰＡ生成株中でＭ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＧＰＡＴ遺伝子過剰発現の影響を調べた。

【０６０６】

ここでのＹ２１０７Ｕ１株（１６％のＥＰＡを生成し、Ｕｒａ－表現型を有する）の開発は、Ｍ４株（８％のＤＧＬＡを生成し、実施例６で記述される）、Ｙ２０４７株（１１％のＡＲＡを生成し、実施例６で記述される）、Ｙ２０４８株（１１％のＥＰＡを生成し、実施例６で記述される）、Ｙ２０６０株（１３％のＥＰＡを生成し、実施例６で記述される）、Ｙ２０７２株（１５％のＥＰＡを生成し、実施例６で記述される）、Ｙ２０７２Ｕ１株（１４％のＥＰＡを生成する）、およびＹ２０８９（１８％のＥＰＡを生成する）の構築を必要とした。

【０６０７】

Ｕｒａ－表現型による全脂質の約１４％のＥＰＡを生成するＹ２０７２Ｕ１株の創生

コンストラクトｐＺＫＵＧＰＩ５Ｓ（図１７Ｂ、配列番号１８７）を作り出して、ＧＰＡＴ：：Ｉ．Δ５Ｓ：：Ｐｅｘ２０キメラ遺伝子をＹ２０７２株（実施例６）のＵｒａ３遺伝子に組み込んだ。より具体的には、プラスミドｐＺＫＵＧＰＩ５Ｓは以下の構成要素を含有した。

【０６０８】

【表５１】

表41

プラスミドpZKUGPI5S（配列番号187）の説明

配列番号187内のRE部位およびヌクレオチド	断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明
BsiWI/PacI（318～1038）	ヤロウィアUra3遺伝子（ジェンバンク登録番号AJ306421）の721bpの5'部分
SalI/ClaI（3882～4606）	ヤロウィアUra3遺伝子（ジェンバンク登録番号AJ306421）の724bpの3'部分
ClaI/BsiWI（4606～318）	以下を含んでなるGPAT::I.Δ5S::Pex20 ● GPAT:GPATプロモーター（配列番号216） ● I.Δ5S:イソクリシス・ガルバナ由来コドン最適化Δ5デサチュラーゼ遺伝子（配列番号10）（国際公開第2002/081668号パンフレット） ● Pex20:ヤロウィアPex20遺伝子のPex20ターミネーター配列（ジェンバンク登録番号AF054613）

【０６０９】

プラスミドｐＺＫＵＧＰＩ５ＳをＳａｌＩ／ＰａｃＩで消化し、次に一般方法に従って使用してＹ２０７２株を形質転換した。質転換に続いて、細胞をＭＭ＋５－ＦＯＡ選択プレート上に播種し、３０℃に３～４日間保った。

【０６１０】

ＭＭ＋５－ＦＯＡプレート上に生育した全部で２４個の形質転換体を拾って、ＭＭプレートおよびＭＭ＋５－ＦＯＡプレート上に別々に再度画線培養した。ＭＭ＋５－ＦＯＡプレート上で生育できるが、ＭＭプレート上では生育できない株をＵｒａ－株として選択した。これらの各２４個のＵｒａ－株を液体ＭＭＵ中に個々に接種して、２５０ｒｐｍ／分で振盪して２日間３０℃で生育させた。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換によって脂肪酸メチルエステルを調製し、引き続いてヒューレットパッカード（Ｈｅｗｌｅｔｔ－Ｐａｃｋａｒｄ）６８９０　ＧＣで分析した。

【０６１１】

ＧＣ分析は、ＭＭＵ中で２日間の生育後に、全脂質の７．３～８．９％のＥＰＡを生成した８株、９～９．９％のＥＰＡを生成した１４株、１０．５％のＥＰＡを生成した１株（すなわち＃１）、および１０．７％のＥＰＡを生成した１株（すなわち＃２３）があったことを示した。株＃１および＃２３を二段階生育条件（すなわち４８時間のＭＭ、９６時間のＨＧＭ）を使用してさらに分析した。ＧＣ分析は、これらの２つの株が二段階生育後に全脂質の約１４％のＥＰＡを生成したことを示した。株＃１を「Ｙ２０７２Ｕ１」株と命名した。

【０６１２】

全脂質の約１８％のＥＰＡを生成するＹ２０８９株の創生

コンストラクトｐＤＭＷ３０２Ｔ１６（図１７Ｃ、配列番号１８６）を作り出して、４つのキメラ遺伝子（$C_{16/18}$エロンガーゼ、$C_{18/20}$エロンガーゼ、Δ６デサチュラーゼ、およびΔ１２デサチュラーゼを含んでなる）のクラスターおよびＵｒａ３遺伝子をＹ２０７２Ｕ１株のヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）リパーゼ１遺伝子部位に組み込んだ。プラスミドｐＤＭＷ３０２Ｔ１６は、以下の構成要素を含有した。

【０６１３】

【表５２】

表42

プラスミドpDMW302T16（配列番号186）の説明

配列番号186内のRE部位およびヌクレオチド	断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明
BsiWI/AscI（1～817）	ヤロウィアリパーゼ1遺伝子（ジェンバンク登録番号Z50020）の817bpの5'部分
SphI/PacI 3525～4294	ヤロウィアリパーゼ1遺伝子（ジェンバンク登録番号Z50020）の769bpの3'部分
EcoRI/BsiWI（13328～1）	以下を含んでなるTEF::rELO2S::Pex20 ● TEF:TEFプロモーター（ジェンバンク登録番号AF054508） ● rELO2S:ラット由来コドン最適化rELO2エロンガーゼ遺伝子（配列番号85）（ジェンバンク登録番号AB071986） ● Pex20:ヤロウィアPex20遺伝子のPex20ターミネーター配列（ジェンバンク登録番号AF054613）
BglII/EcoRI（10599～13306）	以下を含んでなるFBAIN::D6S::Lip1 ● FBAIN:FBAINプロモーター（配列番号214） ● Δ6S:*モルティエラ・アルピナ*由来コドン最適化Δ6デサチュラーゼ遺伝子（配列番号3）（ジェンバンク登録番号AF465281） ● Lip1:ヤロウィアLip1遺伝子からのLip1ターミネーター配列（ジェンバンク登録番号Z50020）
ClaI/PmeI（8078～10555）	以下を含んでなるGPDIN::EL1S::Lip2 ● GPDIN:GPDINプロモーター（配列番号211） ● EL1S:*モルティエラ・アルピナ*由来コドン最適化エロンガーゼ1遺伝子（配列番号24）（ジェンバンク登録番号AX464731） ● Lip2:ヤロウィアリパーゼ2遺伝子のLip2ターミネーター（ジェンバンク登録番号AJ012632）
EcoRI/ClaI（6450～8078）	ヤロウィアUra3遺伝子（ジェンバンク登録番号AJ306421）
PacI/EcoRI（4294～6450）	以下を含んでなるTEF::F.Δ12::Pex16 ● TEF:TEFプロモーター（ジェンバンク登録番号AF054508） ● F.Δ12:フザリウム・モニリフォルメΔ12デサチュラーゼ遺伝子（配列番号32） ● Pex16:ヤロウィアPex16遺伝子のPex16ターミネーター（ジェンバンク登録番号U75433）

【０６１４】

プラスミドｐＤＭＷ３０２Ｔ１６をＳｐｈＩ／ＡｓｃＩで消化し、次に一般方法に従って使用してＹ２０７２Ｕ１株を形質転換した。形質転換に続いて細胞をＭＭプレート上に播種して、３０℃に３～４日間保った。

【０６１５】

ＭＭプレート上に生育した全部で４８個の形質転換体を拾って、新鮮なＭＭプレート上に再度画線培養した。生育したらこれらの株を液体ＭＭ中に個々に接種して、３０℃および２５０ｒｐｍ／分で２日間振盪して生育させた。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換によって脂肪酸メチルエステルを調製し、引き続いてヒューレットパッカード（Ｈｅｗｌｅｔｔ－Ｐａｃｋａｒｄ）６８９０　ＧＣで分析した。

【０６１６】

ＧＣ分析は、ＭＭ培地中での２日間の生育後に、ほとんど全てのｐＤＭＷ３０２Ｔ１６によるＹ２０７２Ｕ１の形質転換体中でＥＰＡが生成されたことを示した。４８個の選択された形質転換体中に、１０％未満のＥＰＡを生成した２７株、１０～１２．９％のＥＰＡを生成した１４株、および１３～１３．９％のＥＰＡを生成した５株があった。二段階生育手順（すなわち４８時間のＭＭ、９６時間のＨＧＭ）を使用したさらなる分析のため

に、株＃３４（１３．９％のＥＰＡを生成する）を選択した。ＧＣ分析は、株＃３４が全脂質の約１８％のＥＰＡを生成したことを示した。株＃３４を「Ｙ２０８９」株と命名した。

【０６１７】

野生型ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＴＣＣ＃２０３６２に対するＹ２０８９株の遺伝子型は、次のとおりであった。Ｐｏｘ３－、ＬＩＰ１－、Ｙ．Δ１２－、ＦＢＡ：：Ｆ．Δ１２：：Ｌｉｐ２、ＴＥＦ：：Ｆ．Δ１２：：Ｐｅｘ１６、ＦＢＡＩＮ：：ＭΔ１２：：Ｐｅｘ２０、ＴＥＦ：：Δ６Ｓ：：Ｌｉｐ１、ＦＢＡＩＮ：：Δ６Ｓ：：Ｌｉｐ１、ＦＢＡＩＮ：：Ｅ１Ｓ：：Ｐｅｘ２０、ＧＰＡＴ：：Ｅ１Ｓ：：Ｏｃｔ、ＧＰＤＩＮ：：Ｅ１Ｓ：：Ｌｉｐ２、ＴＥＦ：：Ｅ２Ｓ：：Ｘｐｒ、ＦＢＡＩＮ：：ＭＡΔ５：：Ｐｅｘ２０、ＴＥＦ：：ＭＡΔ５：：Ｌｉｐ１、ＴＥＦ：：ＨΔ５Ｓ：：Ｐｅｘ１６、ＴＥＦ：：ＩΔ５Ｓ：：Ｐｅｘ２０、ＧＰＡＴ：：ＩΔ５Ｓ：：Ｐｅｘ２０、ＦＢＡＩＮ：：Δ１７Ｓ：：Ｌｉｐ２、ＦＢＡＩＮｍ：：Δ１７Ｓ：：Ｐｅｘ１６、ＴＥＦ：：Δ１７Ｓ：：Ｐｅｘ１６、および２ＸＴＥＦ：：ｒＥＬＯ２Ｓ：：Ｐｅｘ２０。

【０６１８】

Ｕｒａ－表現型による全脂質の約１６％のＥＰＡを生成するＹ２１０７Ｕ１株の創生

コンストラクトｐＺＫＵＧＰＥ１Ｓ（配列番号１８７）を作り出して、ＧＰＡＴ：：ＥＬ１Ｓ：：Ｐｅｘ２０キメラ遺伝子をＹ２０８９株のＵｒａ３遺伝子に組み込んだ。より具体的にはプラスミドｐＺＫＵＧＰＥ１Ｓは、以下の構成要素を含有した。

【０６１９】

【表５３】

表43

プラスミドpZKUGPE1S（配列番号187）の説明

配列番号187内のRE部位およびヌクレオチド	断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明
BsiWI/PacI（318～1038）	ヤロウィアUra3遺伝子（ジェンバンク登録番号AJ306421）の721bpの5'部分
SalI/ClaI（3882～4606）	ヤロウィアUra3遺伝子（ジェンバンク登録番号AJ306421）の724bpの3'部分
ClaI/BsiWI（4606～318）	以下を含んでなるGPAT::E1S::Pex20 ● GPAT:GPATプロモーター（配列番号216） ● EL1S:*モルティエラ・アルピナ*由来コドン最適化エロンガーゼ1遺伝子（配列番号24）（ジェンバンク登録番号AX464731） ● Pex20:ヤロウィアPex20遺伝子のPex20ターミネーター配列（ジェンバンク登録番号AF054613）

【０６２０】

プラスミドｐＺＫＵＧＰＥ１ＳをＰｓｔＩ／ＰａｃＩで消化し、次に一般方法に従って使用してＹ２０８９株を形質転換した。形質転換に続いて細胞をＭＭ＋５－ＦＯＡ選択プレート上に播種し、３０℃に３～４日間保った。

【０６２１】

ＭＭ＋５－ＦＯＡプレート上に生育した全部で８個の形質転換体を拾って、ＭＭプレートおよびＭＭ＋５－ＦＯＡプレート上に別々に再度画線培養した。ＭＭ＋５－ＦＯＡプレート上で生育できるが、ＭＭプレート上では生育できない株をＵｒａ－株として選択した。これらの８個の各Ｕｒａ－株を液体ＭＭＵ中に個々に接種して、２５０ｒｐｍ／分で振盪して２日間３０℃で生育させた。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換によって脂肪酸メチルエステルを調製し、引き続いてヒューレットパッカード（Ｈｅｗｌｅｔｔ－Ｐａｃｋａｒｄ）６８９０　ＧＣで分析した。

【０６２２】
ＧＣ分析は、ＭＭＵ中での２日間の生育後に、全脂質の６．６～８．７％のＥＰＡを生成した６株および９．４～１０％のＥＰＡを生成した２株（すなわち＃４および＃５）があったことを示した。株＃４および＃５を二段階生育条件（すなわち４８時間のＭＭ、９６時間のＨＧＭ）を使用してさらに分析した。ＧＣ分析は、これらの２つの株が二段階生育後に全脂質の約１６％のＥＰＡを生成したことを示した。株＃４を「Ｙ２１０７Ｕ１」株と命名し、株＃５を「Ｙ２１０７Ｕ２」株と命名した。
【０６２３】
実施例１５
全脂質の９～１２％のＥＰＡを生成する間性ＭＵ株の創生
本実施例は、全脂質に比べて顕著な濃度のＥＰＡを生成できるヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＴＣＣ＃２０３６２由来のＭＵ株の構築について述べる（図５）。実施例２７（下記）で記述されるようにして、ＴＡＧ含有量および／または組成の分析に基づいて、様々な天然Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）アシルトランスフェラーゼノックアウトの影響をこのＥＰＡ生成株で調べた。
【０６２４】
ＭＵ株（ここで９～１２％のＥＰＡを生成する）の開発は、Ｍ４株（８％のＤＧＬＡを生成し、実施例６で記述される）、Ｙ２０３４株（１０％のＡＲＡを生成し、実施例１３で記述される）、Ｅ株（１０％のＥＰＡを生成し、実施例１３で記述される）、ＥＵ株（１０％のＥＰＡを生成し、実施例１３で記述される）、および株Ｍ２６（１４％のＥＰＡを生成する）の構築を必要とした。
【０６２５】
全脂質の約１４％のＥＰＡを生成するＭ２６株の創生
コンストラクトｐＫＯ２ＵＭ２６Ｅ（配列番号１８８、図１７Ｄ）を使用して、３つのキメラ遺伝子（$C_{18/20}$エロンガーゼ、Δ６デサチュラーゼ、およびΔ１２デサチュラーゼを含んでなる）およびＵｒａ３遺伝子のクラスターをＥＵ株のヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）Δ１２デサチュラーゼ遺伝子部位（実施例１３）に組み込んだ。プラスミドｐＫＯ２ＵＭ２６Ｅは、以下の構成要素を含有した。
【０６２６】

【表５４】

表44

プラスミドpKO2UM26E（配列番号188）の説明

配列番号188内のRE部位およびヌクレオチド	断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明
HindIII/AscI（1～728）	ヤロウィアΔ12デサチュラーゼ遺伝子（配列番号28）の728bpの5'部分
SphI/EcoRI（3436～3992）	ヤロウィアΔ12デサチュラーゼ遺伝子（配列番号28）の556bpの3'部分
BsiWI/HindIII（11095～1）	以下を含んでなるGPAT::EL1S::XPR ● GPAT:GPATプロモーター（配列番号216） ● EL1S:*モルティエラ・アルピナ*由来コドン最適化エロンガーゼ1遺伝子（配列番号24）（ジェンバンク登録番号AX464731） ● XPR:ヤロウィアXpr遺伝子（ジェンバンク登録番号M17741）の約100bpの3'領域
BglII/BsiWI（8578～11095）	以下を含んでなるFBAIN::M.Δ12::Pex20 ● FBAIN:FBAINプロモーター（配列番号214） ● M.Δ12:モルティエラ・イザベリナΔ12デサチュラーゼ遺伝子（ジェンバンク登録番号AF417245、配列番号30） ● Pex20:ヤロウィアPex20遺伝子のPex20ターミネーター配列（ジェンバンク登録番号AF054613）
SalI/PacI（6704～8202）	ヤロウィアUra3遺伝子（ジェンバンク登録番号AJ306421）
EcoRI/SalI (3992-6704)	以下を含んでなるFBAIN::M.Δ6B::Pex20, ● TEF: TEF プロモーター（配列番号 054508） ● M.Δ6B: *モルティエラ・アルピナ*Δ6 デサチュラーゼ遺伝子"B"（ジェンバンク登録番号 AB070555、配列番号 4） ● Pex20:ヤロウィア Pex20 遺伝子の Pex20 ターミネーター配列（ジェンバンク登録番号 AF054613）

【０６２７】

プラスミドｐＫＯ２ＵＭ２６ＥをＳｐｈＩ／ＡｓｃＩで消化し、次に一般方法に従って使用して、ＥＵ株（実施例１３）を形質転換した。形質転換に続いて、細胞をＭＭプレート上に播種して、３０℃に２～３日間保った。

【０６２８】

ＭＭプレート上に生育した全部で４８個の形質転換体を拾って、新鮮な上にＭＭプレート再度画線培養した。生育したらこれらの株を３０℃の液体ＭＭ中に個々に接種して、２５０ｒｐｍ／分で振盪しながら１日間生育させた。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換によって脂肪酸メチルエステルを調製し、引き続いてヒューレットパッカード（Ｈｅｗｌｅｔｔ－Ｐａｃｋａｒｄ）６８９０　ＧＣで分析した。

【０６２９】

ＧＣ分析は、ＭＭ培地中での１日間の生育後に、ほとんど全てのｐＫＯ２ＵＭ２６Ｅによる形質転換体中でＥＰＡが生成したことを示した。４８個の選択された形質転換体中に、組換えヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）中の全脂質の４％未満のＥＰＡを生成した５株、４～５．９％のＥＰＡを生成した２３株、６～６．９％のＥＰＡを生成した９株、および７～８．２％のＥＰＡを生成した１１株があった。二段階生育手順（すなわち４８時間のＭＭ、９６時間のＨＧＭ）を使用したさらなる分析のために、８．２％のＥＰＡを生成した株を選択した。ＧＣ分析は、組換え株が全脂質の約１４％のＥＰＡを生成したことを示した。株を「Ｍ２６」株と命名した。

【０６３０】

野生型ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＴＣＣ＃２０３６２に対するＭ２６株の遺伝子型は、次のとおりであった。Ｐｏｘ３－、Ｙ．

Δ１２－、ＦＢＡ：：Ｆ．Δ１２：：Ｌｉｐ２、ＦＢＡＩＮ：：ＭΔ１２：：Ｐｅｘ２０、ＴＥＦ：：Δ６Ｓ：：Ｌｉｐ１、ＦＢＡＩＮ：：Δ６Ｂ：：Ｐｅｘ２０、ＦＢＡＩＮ：：Ｅ１Ｓ：：Ｐｅｘ２０、ＧＰＡＴ：：Ｅ１Ｓ：：Ｘｐｒ、ＴＥＦ：：Ｅ２Ｓ：：Ｘｐｒ、ＦＢＡＩＮ：：ＭＡΔ５：：Ｐｅｘ２０、ＴＥＦ：：ＭＡΔ５：：Ｌｉｐ１、ＴＥＦ：：ＨΔ５Ｓ：：Ｐｅｘ１６、ＦＢＡＩＮ：：Δ１７Ｓ：：Ｌｉｐ２、ＦＢＡＩＮｍ：：Δ１７Ｓ：：Ｐｅｘ１６、ＴＥＦ：：Δ１７Ｓ：：Ｐｅｘ１６、およびＴＥＦ：：ｒＥＬＯ２Ｓ：：Ｐｅｘ２０。

【０６３１】

全脂質の約１４％のＥＰＡを生成するＭＵ株の創生

ＭＵ株は、Ｍ２６株のＵｒａ栄養要求株であった。この株は、ＰａｃＩおよびＨｉｎｃＩＩで消化した５μｇのプラスミドｐＺＫＵＭ（配列番号１８９）で、株Ｍ２６を形質転換して作った。形質転換は、カリフォルニア州オレンジのザイモリサーチ社（Ｚｙｍｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｏｒｐ．（Ｏｒａｎｇｅ，ＣＡ））からのフローズン（Ｆｒｏｚｅｎ）－ＥＺ酵母形質転換キットを使用して実施し、１００μｌの形質転換された細胞混合物を以下の培地を含む寒天プレート上に播種して形質転換体を選択した。ミシガン州デトロイトのディフコ・ラボラトリーズ（ＤＩＦＣＯ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（Ｄｅｔｒｏｉｔ，ＭＩ））からの６．７ｇ／Ｌの酵母菌窒素ベース、２０ｇ／Ｌのデキストロース、５０ｍｇ／Ｌのウラシル、および８００ｍｇ／ＬのＦＯＡ。７日後に、小型コロニーが出現し、それをＭＭおよびＭＭＵ寒天プレートに播種した。全てＵＲＡ栄養要求株であった。株の１つを「ＭＵ」と命名した。

【０６３２】

実施例１６

モルティエラ・アルピナ（Ｍｏｒｔｉｅｒｅｌｌａ ａｌｐｉｎａ）ゲノムＤＮＡおよびｃＤＮＡの調製

本実施例は、モルティエラ・アルピナ（Ｍｏｒｔｉｅｒｅｌｌａ ａｌｐｉｎａ）（ＡＴＣＣ＃１６２６６）からのゲノムＤＮＡおよびｃＤＮＡの調製について述べる。これは実施例１７、１８、１９、２０、および２１でそれぞれ述べられるように、Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＬＰＡＡＴ２、ＤＧＡＴ１、ＤＧＡＴ２、ＧＰＡＴ、およびＥＬＯ３の単離を可能にする。

【０６３３】

モルティエラ・アルピナ（Ｍｏｒｔｉｅｒｅｌｌａ ａｌｐｉｎａ）からのゲノムＤＮＡの調製

キアゲン（Ｑｉａｇｅｎ）からのキアプレップ（ＱｉａＰｒｅｐ）スピンミニプレップキット（カタログ番号６２７１０６）を使用してモルティエラ・アルピナ（Ｍｏｒｔｉｅｒｅｌｌａ ａｌｐｉｎａ）（ＡＴＣＣ＃１６２６６）からゲノムＤＮＡを単離した。ＹＰＤ寒天プレート（２％バクトイースト抽出物、３％バクトペプトン、２％グルコース、２．５％バクト寒天）上に生育した細胞をこすり取り１．２ｍＬのキット緩衝液Ｐ１に再懸濁した。再懸濁した細胞をそれぞれ０．６ｍＬのガラスビーズ（０．５ｍｍ径）を含有する２本の２．０ｍＬネジ蓋管に入れた。オクラホマ州バートルズビルのバイオスペック（Ｂｉｏｓｐｅｃ（Ｂａｒｔｌｅｓｖｉｌｌｅ，ＯＫ））からのミニビーズビーターの均質化（ＨＯＭＯＧＥＮＩＺＥ）設定において、細胞を２分間均質化した。次に管をエッペンドルフ（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）微量遠心管内で１４，０００ｒｐｍで２分間遠心分離した。上清（０．７５ｍＬ）を３本の１．５ｍＬ微量遠心管に移した。各管に等容積のキット緩衝液Ｐ２を添加した。管を３回反転して混合した後、０．３５ｍＬの緩衝液Ｎ３を各管に添加した。各管の内容物を全部で５回反転させて、再度混合した。混合物をエッペンドルフ（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）微量遠心管中で１４，０００ｒｐｍで５分間遠心分離した。各管からの上清を３本の別々のキットスピンカラムに個別に移した。次にカラムに以下の処理を行った。遠心分離（１４，０００ｒｐｍで１分間）、緩衝液ＰＥで１回洗浄、遠心分離（１４，０００ｒｐｍで１分間）、次に最終遠心分離（１４，０００ｒｐｍで１分間）。各カラムに緩衝液ＥＢ（５０μＬ）を添加して、１分間静置した。次にゲノムＤＮ

Ａを１４，０００ｒｐｍで１分間の遠心分離によって溶出した。
【０６３４】
モルティエラ・アルピナ（Ｍｏｒｔｉｅｒｅｌｌａ　ａｌｐｉｎａ）からのｃＤＮＡの調製
カナダ国オンタリオ州ミシサーガのＢＤクローンテック（ＢＤ－Ｃｌｏｎｔｅｃｈ（Ｍｉｓｓｉｓｓａｕｇａ，ＯＮ，Ｃａｎａｄａ）からのクリエーター・スマート（Ｃｒｅａｔｏｒ　Ｓｍａｒｔ）（登録商標）ｃＤＮＡライブラリーキットを使用して、製造業者のプロトコルに従ってモルティエラ・アルピナ（Ｍｏｒｔｉｅｒｅｌｌａ　ａｌｐｉｎａ）ｃＤＮＡを調製した。
【０６３５】
具体的にはＭ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＡＴＣＣ＃１６２６６株を６０ｍＬのＹＰＤ培地（２％バクトイースト抽出物、３％バクトペプトン、２％グルコース）中で３日間２３℃で生育させた。ベックマン（Ｂｅｃｋｍａｎ）ＧＨ３．８ローター内での３７５０ｒｐｍで１０分間の遠心分離によって細胞をペレット化し、インビトロジェン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）からの６×０．６ｍＬのトリゾール試薬中に再懸濁した。再懸濁した細胞をそれぞれ０．６ｍＬの０．５ｍｍガラスビーズを含有する６本の２ｍＬネジ蓋管に移した。バイオスペック（Ｂｉｏｓｐｅｃ）ミニビーズビーターの均質化設定において、細胞を２分間均質化した。管を短時間遠沈して、ビーズを沈下させた。液体を４本の新鮮な１．５ｍＬ微量遠心管に移して、各管に０．２ｍＬのクロロホルム／イソアミルアルコール（２４：１）を添加した。管を手で１分間振盪し、３分間静置した。次に管を４℃において１４，０００ｒｐｍで１０分間遠沈した。上層を４本の新しい管に移した。各管にイソプロピルアルコール（０．５ｍＬ）を添加した。管を室温で１５分インキュベートし、続いて４℃において１４，０００ｒｐｍで１０分間遠心分離した。ペレットをＲＮＡ分解酵素を含まない水で作った７５％エタノール各１ｍＬで洗浄し風乾した。次に全ＲＮＡサンプルを５００μＬの水に再溶解し１：５０希釈ＲＮＡサンプルを使用して、Ａ２６０ｎｍでＲＮＡ量を測定した。全部で３．１４ｍｇのＲＮＡが得られた。
【０６３６】
この全ＲＮＡサンプルをキアゲン（Ｑｉａｇｅｎ）ＲＮｅａｓｙ全ＲＮＡミディ（Ｍｉｄｉ）キットで、製造業者のプロトコルに従ってさらに精製した。このようにして全ＲＮＡサンプルを２ｍＬに希釈して、８０μＬのβ－メルカプトエタノールおよび５．６ｍＬの１００％エタノールを添加した８ｍＬのＲＬＴ緩衝液と混合した。サンプルを４つの部分に分割し、４本のＲＮｅａｓｙミディ（Ｍｉｄｉ）カラムに装入した。次にカラムを５分間４５００×ｇで遠心分離した。カラムを洗浄するために２ｍＬのＲＰＥ緩衝液を装入し、カラムを２分間４５００×ｇで遠心分離した。洗浄ステップを１回繰り返したが、遠心分離時間は５分間に延長した。各カラムに２５０μＬのＲＮＡ分解酵素を含まない水を添加して全ＲＮＡを溶出し、１分間待って４５００×ｇで３分間遠心処理した。
【０６３７】
次にアマシャム・バイオサイエンス（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）のｍＲＮＡ精製キットのプロトコルに従って、上の全ＲＮＡサンプルからＰｏｌｙＡ（＋）ＲＮＡを単離した。簡単に述べると、２オリゴ－ｄＴ－セルロースカラムを使用した。カラムを各１ｍＬの高塩濃度緩衝液で２回洗浄した。前段階からの全ＲＮＡサンプルを２ｍＬの全容積に希釈して、１０ｍＭトリス／ＨＣｌ、ｐＨ８．０、１ｍＭ　ＥＤＴＡに調節した。サンプルを６５℃で５分間加熱し、次に氷上にのせた。サンプル緩衝液（０．４ｍＬ）を添加して、次にサンプルを重力供給法下で２本のオリゴ－ｄＴ－セルロースカラムに装入した。カラムを３５０×ｇで２分間遠心分離し、各０．２５ｍＬの高塩濃度緩衝液で２回洗浄し、毎回それに３５０×ｇで２分間の遠心分離が続いた。同一の遠心分離ルーチンに従って、カラムを低塩濃度緩衝液でさらに３回洗浄した。カラムを６５℃に予熱された溶出緩衝液各０．２５ｍＬで４回洗浄して、Ｐｏｌｙ（Ａ）＋ＲＮＡを溶出し、同一の遠心分離手順がそれに続いた。精製プロセス全体をもう１回繰り返した。精製ｐｏｌｙ（Ａ）＋ＲＮＡを３０．４ｎｇ／μＬの濃度で得た。

【０６３８】
ＢＤクローンテック（ＢＤ－Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）によって規定されるＬＤ－ＰＣＲ法、および０．１μｇのｐｏｌｙＡ（＋）ＲＮＡサンプルを使用して、ｃＤＮＡを発生させた。具体的には第１ストランドｃＤＮＡ合成のために、３μＬのｐｏｌｙ（Ａ）＋ＲＮＡサンプルと、１μＬのＳＭＡＲＴ　ＩＶオリゴヌクレオチド（配列番号３９１）および１μＬのＣＤＳＩＩＩ／３’ＰＣＲプライマー（配列番号３９２）とを混合した。混合物を７２℃に２分間加熱して、氷上で２分間冷却した。２μＬの第１ストランド緩衝液、１μＬの２０ｍＭ　ＤＴＴ、１μＬの１０ｍＭ　ｄＮＴＰミクス、および１μＬのパワースクリプト（Ｐｏｗｅｒｓｃｒｉｐｔ）逆転写酵素を管に添加した。混合物を４２℃で１時間インキュベートし、氷上で冷却した。

【０６３９】
第１ストランドｃＤＮＡ合成混合物をＰＣＲ反応のためのテンプレートとして使用した。具体的には反応混合物は次を含有した。２μＬの第１ストランドｃＤＮＡ混合物、２μＬの５’－ＰＣＲプライマー（配列番号３９３）、２μＬのＣＤＳＩＩＩ／３’－ＰＣＲプライマー（配列番号３９２）、８０μＬの水、１０μＬの１０×アドバンテージ（Ａｄｖａｎｔａｇｅ）２ＰＣＲ緩衝液、２μＬの５０×ｄＮＴＰミクス、および２μＬの５０×アドバンテージ（Ａｄｖａｎｔａｇｅ）２ポリメラーゼミクス。サーモサイクラー条件をＧｅｎＡｍｐ９６００装置上において次のように設定した。９５℃で２０秒間と、それに続く９５℃で５秒間および６８℃で６分間を１４～２０サイクル。ＰＣＲ生成物をアガロースゲル電気泳動法および臭化エチジウム染色によって定量した。

【０６４０】
上の７５μＬのＰＣＲ生成物（ｃＤＮＡ）と、キットで提供される３μＬの２０μｇ／μＬタンパク質分解酵素Ｋとを混合した。混合物を４５℃で２０分間インキュベートし、次に７５μＬの水を添加して、混合物を１５０μＬのフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール混合物（２５：２４：１）で抽出した。水相を１５０μＬのクロロホルム：イソアミルアルコール（２５：１）でさらに抽出した。次に水相を１５μＬの３Ｍ酢酸ナトリウム、２μＬの２０μｇ／μＬのグリコーゲン、および４００μＬの１００％エタノールと混合した。混合物を即座に微量遠心管中で、室温において１４０００ｒｐｍで２０分間遠心分離した。ペレットを１５０μＬの８０％エタノールで１回洗浄し、風乾させて７９μＬの水に溶解した。

【０６４１】
溶解したｃＤＮＡを引き続いてＳｆｉＩで消化した（７９μＬのｃＤＮＡと、１０μＬの１０×ＳｆｉＩ緩衝液、１０μＬのＳｆｉＩ酵素、および１μＬの１００×ＢＳＡとを混合し、混合物を５０℃で２時間インキュベートした）。キシレンシアノール染料（２μＬの１％）を添加した。次に製造業者の手順に正確に従って、混合物をキットで提供されるクロマスピン（Ｃｈｒｏｍａ　Ｓｐｉｎ）４００カラム上で分画した。画分をカラムから収集し、アガロースゲル電気泳動法で分析した。ｃＤＮＡを含有する第１の３つの画分をプールして、ｃＤＮＡをエタノールで沈殿した。沈殿したｃＤＮＡを７μＬの水に再溶解して、キットで提供されるｐＤＮＲ－ＬＩＢにライゲートした。

【０６４２】
ライブラリー配列決定
ライゲーション生成物を使用して、ストラタジーン（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）からの大腸菌（Ｅ．Ｃｏｌｉ）ＸＬ－１ブルー電気穿孔コンピテント細胞を形質転換した。推定総数2×10^{6}個のコロニーが得られた。マサチューセッツ州ベバリーのアージンコート・バイオサイエンス社（Ａｇｅｎｃｏｕｒｔ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ（Ｂｅｖｅｒｌｙ，ＭＡ））によってＭ１３順方向プライマー（配列番号３９４）を使用して、ｃＤＮＡライブラリーの配列決定を実施した。

【０６４３】
実施例１７
パーセントＰＵＦＡを増大させるモルティエラ・アルピナ（Ｍｏｒｔｉｅｒｅｌｌａ　ａ

ｌｐｉｎａ）ＬＰＡＡＴ２の発現
本実施例は、Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＬＰＡＡＴ２（配列番号１１０および１１１）を同時発現するように形質転換された、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）Ｙ２０６７Ｕ株（実施例１３）における増大するＥＰＡ生合成および蓄積について述べる。Δ６デサチュラーゼ／Δ６エロンガーゼ経路またはΔ９エロンガーゼ／Δ８デサチュラーゼ経路のどちらかを通じてＤＮＡを生成するように遺伝子操作されたＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）宿主株は、Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＬＰＡＡＴ２がそこで（例えば株Ｙ３０００）同様に同時発現されれば、増大するＤＮＡ生合成および蓄積を実証できることが考察される。

【０６４４】

Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＬＰＡＡＴ２　ＯＲＦを次のようにしてローンした。プライマーＭＬＰＡＴ－ＦおよびＭＬＰＡＴ－Ｒ（配列番号３９５および３９６）を使用して、ＰＣＲによってＭ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ｃＤＮＡ（実施例１６）からＬＰＡＡＴ２ＯＲＦを増幅した。反応混合物は、１μＬのｃＤＮＡ、各１μＬのプライマー、２２μＬの水、および日本国滋賀県大津市５２０－２１９３のタカラバイオからの２５μＬのＥｘＴａｑプレミクス２×Ｔａｑ　ＰＣＲ溶液を含有した。増幅を次のようにして実施した。９４℃で１５０秒間の初期変性、続いて９４℃で３０秒間の変性、５５℃で３０秒間のアニーリング、および７２℃で９０秒間の延長を３０サイクル。７２℃で１０分間の最終延長サイクルを実施し、続いて４℃での反応終結。約９５０ｂｐのＤＮＡ断片がＰＣＲ反応から得られた。これをカリフォルニア州バレンシアのキアゲン（Ｑｉａｇｅｎ（Ｖａｌｅｎｃｉａ，ＣＡ））のＰＣＲ精製キットを使用して、製造業者のプロトコルに従って精製した。精製されたＰＣＲ生成物をＮｃｏＩおよびＮｏｔＩで消化し、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中での発現のために、遺伝子が、自律複製ベクター中のＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＦＢＡＩＮプロモーターおよびＰＥＸ２０－３’ターミネーター領域の制御下にあるようにして、Ｎｃｏ　Ｉ－Ｎｏｔ　Ｉ切断ｐＺＵＦ１７ベクター（配列番号１６２、図９Ｂ）中にクローンした。正確な形質転換体をミニプレップＤＮＡの制限酵素分析によって確認し、得られたプラスミドを「ｐＭＬＰＡＴ－１７」（配列番号１９０）と命名した。

【０６４５】

Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＬＰＡＡＴ２をヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ゲノム中に組み込むために、プラスミドｐＭＬＰＡＴ－Ｉｎｔを作り出した。プライマーＬＰＡＴ－Ｒｅ－５－１およびＬＰＡＴ－Ｒｅ－５－２（配列番号３９７および３９８）を使用して、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＬＰＡＡＴ１（配列番号１１２）のＡＵＧのすぐ上流にあるＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ゲノムの１１０３ｂｐの断片を含有する、１１２９ｂｐのＤＮＡ断片であるＹＬＰＡＴ－５’（配列番号３９９）を増幅した。反応混合物は、１μＬのＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ゲノムＤＮＡ、各１μＬのプライマー、２２μＬの水、およびタカラ（ＴａＫａＲａ）からの２５μＬのＥｘＴａｑプレミクス２×Ｔａｑ　ＰＣＲ溶液を含有した。増幅を上述のように実施した。ＰＣＲ反応から約１１３０ｂｐのＤＮＡ断片が得られた。それをキアゲン（Ｑｉａｇｅｎ）のＰＣＲ精製キットを使用して、製造業者のプロトコルに従って精製した。精製されたＰＣＲ生成物をＳａｌＩおよびＣｌａＩで消化し、ＳａｌＩ－ＣｌａＩ切断ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＳＫ（－）ベクター中にクローンして、プラスミド「ｐＹＬＰＡＴ－５」をもたらした。

【０６４６】

次に上と同じ条件を使用して、プライマーＬＰＡＴ－Ｒｅ－３－１およびＬＰＡＴ－Ｒｅ－３－２（配列番号４００および４０１）を使用して、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＬＰＡＡＴ１の停止コドンのすぐ後ろにあるＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ゲノムの９０３ｂｐの断片を含有する９３８ｂｐの断片であるＹＬＰＡＴ－３’（配列番号４０２）を増幅した。精製されたＰＣＲ生成物をＣｌａＩおよびＸｈｏＩで消化し、ＣｌａＩ－ＸｈｏＩ消化ｐＹＬＰＡＴ－５’中にクローンした。正確な形質転

換体をミニプレップ分析で確認し、得られたプラスミドを「ｐＹＬＰＡＴ－５’－３’」と命名した。

【０６４７】

次にｐＭＬＰＡＴ－１７（配列番号１９０）をＣｌａＩおよびＮｏｔＩで消化し、キアゲン（Ｑｉａｇｅｎ）ＱｉａｅｘＩＩゲル精製キットを使用して製造業者のプロトコルに従って、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＵＲＡ３遺伝子、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＦＢＡＩＮプロモーター、およびＭ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＬＰＡＡＴ２遺伝子を含有する約３．５ｋｂの断片を単離した。この断片をＣｌａＩ－ＮｏｔＩ消化ｐＹＬＰＡＴ－５’－３’中にクローンした。正確な形質転換体をミニプレップおよび制限酵素分析によって確認した。得られたプラスミドを「ｐＭＬＰＡＴ－Ｉｎｔ」（配列番号１９１）と命名した。

【０６４８】

「対照」ベクターｐＺＵＦ－ＭＯＤ－１（配列番号１９２、図１８）を次のようにして調製した。最初にプライマーｐｚｕｆ－ｍｏｄ１およびｐｚｕｆ－ｍｏｄ２（配列番号４０３および４０４）を使用し、カリフォルニア州パロアルトのクローンテック（ＣｌｏｎＴｅｃｈ（ＰａｌｏＡｌｔｏ，ＣＡ））からのｐＤＮＲ－ＬＩＢをテンプレートとして使用して、２５２ｂｐの「スタッファー」ＤＮＡ断片を増幅した。増幅された断片をキアゲン（Ｑｉａｇｅｎ）キアクイック（ＱｉａＱｕｉｃｋ）ＰＣＲ精製キットによって精製し、標準条件を使用してＮｃｏＩおよびＮｏｔＩで消化して、次にキアクイック（ＱｉａＱｕｉｃｋ）ＰＣＲ精製キットによって再度精製した。この断片を同様に消化されたＮｃｏＩ－／ＮｏｔＩ切断ｐＺＵＦ１７ベクター（配列番号１６２、図９Ｂ）にライゲートして、得られたライゲーション混合物を使用してインビトロゲン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）からの大腸菌（Ｅ．Ｃｏｌｉ）Ｔｏｐ１０細胞を形質転換した。得られた４個のコロニーからキアゲン（Ｑｉａｇｅｎ）キアプレップ（ＱｉａＰｒｅｐ）スピンミニプレップキットを使用して、プラスミドＤＮＡを精製した。精製プラスミドをＮｃｏＩおよびＮｏｔＩで消化して、約２５０ｂｐの断片の存在を確認した。得られたプラスミドを「ｐＺＵＦ－ＭＯＤ－１」と命名した（配列番号１９２）。

【０６４９】

一般方法に従って、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）Ｙ２０６７Ｕ株（実施例１３、全脂質の１４％のＥＰＡを生成する）をプラスミドｐＭＬＰＡＴ－１７、プラスミドｐＺＵＦ－ＭＯＤ－１（対照）、およびＳｐｅＩ／ＸｂａＩ消化プラスミドｐＭＬＰＡＴ－Ｉｎｔで個々に形質転換した。形質転換体をアミノ酸強化した合成ＭＭ中で２日間生育させ、ＨＧＭ中での４日間がそれに続いた。（一般方法で述べられるような）ＧＣ分析に基づく、ｐＺＵＦ－ＭＯＤ－１を含有する２つの形質転換体、ｐＭＬＰＡＴ－１７を含有する２つの形質転換体、およびゲノムに組み込まれたｐＭＬＰＡＴ－Ｉｎｔを有する２つの形質転換体の脂肪酸プロフィールを下の表に示す。脂肪酸は１８：０、１８：１（オレイン酸）、１８：２（ＬＡ）、ＧＬＡ、ＤＧＬＡ、ＡＲＡ、ＥＴＡ、およびＥＰＡとして同定され、それぞれの組成は、全脂肪酸の％で表される。

【０６５０】

【表５５】

表45

*M.アルピナ*LPAAT2を過剰発現するように
遺伝子操作された*ヤロウィア*Y2067U株の脂質組成

株	全脂肪酸							
	18:0	18:1	18:2	GLA	DGLA	ARA	ETA	EPA
Y2067U+pZUF-MOD-1 #1	1.1	4.7	10.9	19.4	6.3	0.9	3.9	13.8
Y2067U+pZUF-MOD-1 #2	0.9	4.4	9.5	19.3	6.6	0.9	4.0	14.1
Y2067U+pMLPAT-17 #1	1.0	4.4	9.8	18.6	5.9	0.8	3.4	15.5
Y2067U+pMLPAT-17 #2	0.7	3.5	8.4	16.7	6.2	1.0	2.9	16.0
Y2067U+pMLPAT-Int #1	1.9	4.9	13.9	21.1	4.8	1.1	2.7	16.6
Y2067U+pMLPAT-Int #2	1.7	4.2	12.1	21.3	5.2	1.2	2.9	17.3

【０６５１】
上で実証されたように、ｐＭＬＰＡＴ－１７からのＭ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＬＰＡＡＴ２の発現は、％ＥＰＡを「対照」株中の約１４％から１５．５～１６％に増大させた。１６．６～１７．３％へのＥＰＡの追加的増大は、Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＬＰＡＡＴ２をｐＭＬＰＡＴ－Ｉｎｔがあるゲノムに組み込むと達成された。例えばＹ２０６７Ｕ株＋ｐＭＬＰＡＴ－Ｉｎｔにおいて、天然ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＬＰＡＡＴ１（配列番号１１２および１１３）および／またはＬＰＡＡＴ２（配列番号１１５および１１６）をノックアウトすれば、追加的増大が期待される。
【０６５２】
実施例１８
パーセントＰＵＦＡを増大させるモルティエラ・アルピナ（Ｍｏｒｔｉｅｒｅｌｌａ　ａｌｐｉｎａ）ＤＧＡＴ１の発現
本実施例は、Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＤＧＡＴ１　ｃＤＮＡ（配列番号１２４）を同時発現するように形質転換された、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）Ｙ２０６７Ｕ株（実施例１３）における増大するＤＨＡ生合成および蓄積について述べる。Δ６デサチュラーゼ／Δ６エロンガーゼ経路またはΔ９エロンガーゼ／Δ８デサチュラーゼ経路のどちらかを通じてＤＨＡを生成するように遺伝子操作されたＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）宿主株は、Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＤＧＡＴ１がそこで（例えばＹ３０００株）同様に同時発現されれば、増大するＥＰＡ生合成および蓄積を実証できることが考察される。
【０６５３】
Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＤＧＡＴ１　ＯＲＦを次のようにしてクローンした。最初にｃＤＮＡのクローニングを助けるために、ＤＧＡＴ１の第２のコドン配列を「ＡＣＡ」から「ＧＣＡ」に変化させ、スレオニンからアラニンへのアミノ酸変化がもたらされた。これは、Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＤＧＡＴ１　ＯＲＦの完全なコード領域をプライマーＭＡＣＡＴ－Ｆ１およびＭＡＣＡＴ－Ｒ（それぞれ配列番号４０５および４０６）で増幅して達成された。具体的にはＰＣＲ反応混合物は、２０μＭのプライマーＭＡＣＡＴ－Ｆ１およびＭＡＣＡＴ－Ｒ溶液各１μＬ、１μＬのＭ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ｃＤＮＡ（前出、実施例１６）、２２μＬの水、および日本国滋賀県大津市５２０－２１９３のタカラバイオからの２５μＬのＥｘＴａｑプレミクス２×Ｔａｑ　ＰＣＲ溶液を含有した。増幅を次のようにして実施した。９４℃で１５０秒間の初期変性、続いて９４℃で３０秒間の変性、５５℃で３０秒間のアニーリング、および７２℃で９０秒間の延長を３０サイクル。７２℃で１０分間の最終延長サイクルを実施し、続いて４℃での反応終結。

約１６００ｂｐのＤＮＡ断片がＰＣＲ反応から得られた。これをキアゲン（Ｑｉａｇｅｎ）のＰＣＲ精製キットを使用して、製造業者のプロトコルに従って精製した。

【０６５４】

ＦＢＡＩＮプロモーターおよびＰＥＸ２０－３’ターミネーター領域の制御下でＯＲＦがクローンされるように、Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＤＧＡＴ１　ＯＲＦをＮｃｏＩ－およびＮｏｔ　Ｉ－消化プラスミドｐＺＵＦ１７（配列番号１６２、図９Ｂ）に挿入した。しかしＤＧＡＴ１　ＯＲＦは内部ＮｃｏＩ部位を含有したので、クローニングのために２つの別々の制限酵素消化を実施することが必要であった。最初に約２μｇの精製ＰＣＲ生成物をＢａｍＨＩおよびＮｃｏ　Ｉで消化した。反応混合物は全容積６０μＬ中に、プロメガ（Ｐｒｏｍｅｇａ）からの各２０Ｕの酵素、および６μＬの制限緩衝液Ｄを含有した。混合物を３７℃で２時間インキュベートした。約３２０ｂｐの断片をアガロースゲル電気泳動法によって分離し、キアゲン（Ｑｉａｇｅｎ）キアエクス（Ｑｉａｅｘ）ＩＩゲル精製キットを使用して精製した。Ｎｃｏ　ＩをＮｏｔ　Ｉで置換したこと以外は、上と同一の反応条件を使用して、別々に約２μｇの精製ＰＣＲ生成物をＢａｍＨＩおよびＮｏｔ　Ｉで消化した。上記のように約１２８０ｂｐの断片が単離され、精製された。最後に約３μｇのｐＺＵＦ１７を上述のようにＮｃｏ　ＩおよびＮｏｔ　Ｉで消化し精製して、約７ｋＢの断片を生じさせた。

【０６５５】

約７ｋＢのＮｃｏ　Ｉ／Ｎｏｔ　ＩｐＺＵＦ１７断片、約３２０ｂｐのＮｃｏ　Ｉ／ＢａｍＨＩ　ＤＧＡＴ１断片、および約１２８０ｂｐのＢａｍＨＩ／Ｎｏｔ　Ｉ　ＤＧＡＴ１断片を三元ライゲーションで共にライゲートし、室温で一晩インキュベートした。ライゲーション混合物は全容積２０μＬ中に、１００ｎｇの７ｋＢの断片、各２００ｎｇの３２０ｂｐおよび１２８０ｂｐの断片、２μＬのリガーゼ緩衝液、およびプロメガ（Ｐｒｏｍｅｇａ）からの２Ｕ　Ｔ４　ＤＮＡリガーゼを含有した。ライゲーション生成物を使用して、製造業者のプロトコルに従ってインビトロゲン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）からの大腸菌（Ｅ．Ｃｏｌｉ）Ｔｏｐ１０化学コンピテント細胞を形質転換した。

【０６５６】

ミニプレップ分析のために、形質転換からの個々のコロニー（総計１２個）を使用して培養を接種した。制限酵素地図および配列決定は、１２個のコロニー中５個が「ｐＭＤＧＡＴ１－１７」と命名された所望のプラスミドを持つことを示した（図１８Ｂ、配列番号１９３）。

【０６５７】

Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）Ｙ２０６７Ｕ株（実施例１３）を一般方法に従って、それぞれｐＭＤＧＡＴ１－１７およびｐＺＵＦ－ＭＯＤ－１（前出、実施例１７）で形質転換した。形質転換体をアミノ酸強化した合成ＭＭ中で２日間生育させ、ＨＧＭ中での４日間がそれに続いた。（一般方法で述べられるような）ＧＣ分析に基づく、ｐＭＤＧＡＴ１－１７を含有する２つの形質転換体、およびｐＺＵＦ－ＭＯＤ－１を含有する２つの形質転換体の脂肪酸プロフィールを下の表４６に示す。脂肪酸は１８：０、１８：１（オレイン酸）、１８：２（ＬＡ）、ＧＬＡ、ＤＧＬＡ、ＡＲＡ、ＥＴＡ、およびＥＰＡとして同定され、それぞれの組成は、全脂肪酸の％で表される。

【０６５８】

【表５６】

表46

*M.アルピナ*DGAT1を過剰発現するように遺伝子操作された

*ヤロウィア*Y2067U株の脂質組成

株	全脂肪酸							
	18:0	18:1	18:2	GLA	DGLA	ARA	ETA	EPA
Y2067U+pZUF-MOD-1 #1	1.31	6.92	12.03	23.11	5.72	1.05	3.80	13.20
Y2067U+pZUF-MOD-1 #2	1.39	6.83	12.15	21.99	5.83	1.07	3.82	13.47
Y2067U+pMDGAT1-17 #1	0.89	7.13	10.87	24.88	5.82	1.19	3.97	14.09
Y2067U+pMDGAT1-17 #2	0.86	7.20	10.25	22.42	6.35	1.26	4.38	15.07

【０６５９】

上で実証されたように、プラスミドｐＭＤＧＡＴ１－１７からのＭ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＤＧＡＴ１の発現は、％ＥＰＡを「対照」株中での約１３．３％から、約１４．１％（「Ｙ２０６７Ｕ＋ｐＭＤＧＡＴ１－１７＃１」）および約１５．１％（「Ｙ２０６７Ｕ＋ｐＭＤＧＡＴ１－１７＃２」）にそれぞれを増大させた。例えばＹ２０６７Ｕ株＋ｐＭＤＧＡＴ１－１７において、天然ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＤＧＡＴ１（配列番号１２２および１２３）をノックアウトすれば、ＥＰＡの追加的増大が期待される。

【０６６０】

実施例１９

パーセントＰＵＦＡを増大させるモルティエラ・アルピナ（Ｍｏｒｔｉｅｒｅｌｌａ ａｌｐｉｎａ）ＤＧＡＴ２

本実施例は、Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＤＧＡＴ２ｃＤＮＡ（配列番号１３６）を同時発現するように形質転換された、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）Ｙ２０６７Ｕ株（実施例１３）における増大するＥＰＡ生合成および蓄積について述べる。Δ６デサチュラーゼ／Δ６エロンガーゼ経路またはΔ９エロンガーゼ／Δ８デサチュラーゼ経路のどちらかを通じてＤＨＡを生成するように遺伝子操作されたＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）宿主株は、Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＤＧＡＴ２がそこで（例えば株Ｙ３０００）同様に同時発現されれば、増大するＤＨＡ生合成および蓄積を実証できることが考察される。

【０６６１】

Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＤＧＡＴ２ＯＲＦを次のようにしてプラスミドｐＺＵＦ１７中にクローンした。最初にＭ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ｃＤＮＡ（前出、実施例１６）からのプライマーＭＤＧＡＴ－ＦおよびＭＤＧＡＴ－Ｒ１（配列番号４０７および４０８）を使用して、ＯＲＦをＰＣＲ増幅した。予測された１０１５ｂｐの断片を単離して精製し、Ｎｃｏ ＩおよびＮｏｔ Ｉで消化して、遺伝子がＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＦＢＡＩＮプロモーターおよびＰＥＸ２０－３’ターミネーター領域の制御下にあるように、Ｎｃｏ Ｉ－Ｎｏｔ Ｉ切断ｐＺＵＦ１７ベクター（配列番号１６２；図９Ｂ）中にクローンした。正確な形質転換体をミニプレップＤＮＡの制限酵素分析によって確認し、得られたプラスミドを「ｐＭＤＧＡＴ２－１７」（配列番号１９４）と命名した。

【０６６２】

一般方法に従って、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）Ｙ２０６７Ｕ株（実施例１３）をそれぞれｐＭＤＧＡＴ２－１７およびｐＺＵＦ－ＭＯＤ－１（前出、実施例１７）で形質転換した。形質転換体をアミノ酸強化合成ＭＭ中で２日間生育させ、ＨＧＭ中での４日間がそれに続いた。（一般方法で述べられるような）ＧＣ分析に基づく、ｐＭＤ

ＧＡＴ２－１７を含有する２つの形質転換体、およびｐＺＵＦ－ＭＯＤ－１を含有する２つの形質転換体の脂肪酸プロフィールを下に示す。脂肪酸は１８：０、１８：１（オレイン酸）、１８：２（ＬＡ）、ＧＬＡ、ＤＧＬＡ、ＡＲＡ、ＥＴＡ、およびＥＰＡとして同定され、それぞれの組成は、全脂肪酸の％で表される。

【０６６３】

【表５７】

表47

*M.アルピナ*DGAT2を過剰発現するように遺伝子操作された

*ヤロウィア*Y2067U株の脂質組成

株	全脂肪酸							
	18:0	18:1	18:2	GLA	DGLA	ARA	ETA	EPA
Y2067U+pZUF-MOD-1 #1	1.31	6.92	12.03	23.11	5.72	1.05	3.80	13.20
Y2067U+pZUF-MOD-1 #2	1.39	6.83	12.15	21.99	5.83	1.07	3.82	13.47
Y2067U+pMDGAT2-17 #1	0.00	7.47	10.77	25.30	5.70	1.43	3.45	15.12
Y2067U+pMDGAT2-17 #2	1.45	7.79	9.96	25.16	6.06	1.25	3.99	15.37

【０６６４】

プラスミドｐＭＤＧＡＴ２－１７からのＭ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＤＧＡＴ２の発現は、％ＥＰＡを「対照」株中の約１３．３％から約１５．２５％（「Ｙ２０６７Ｕ＋ｐＭＤＧＡＴ２－１７」）に増大させた。例えばＹ２０６７Ｕ株＋ｐＭＤＧＡＴ２－１７中で天然ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＤＧＡＴ２（配列番号１３０～１３５）をノックアウトすれば、ＥＰＡの追加的増大が期待される。

【０６６５】

実施例２０

パーセントＰＵＦＡを増大させるモルティエラ・アルピナ（Ｍｏｒｔｉｅｒｅｌｌａ　ａｌｐｉｎａ）ＧＰＡＴ

本実施例は、Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＧＰＡＴ　ＯＲＦ（配列番号１３８）を同時発現するように形質転換された、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）Ｙ２１０７Ｕ１株（実施例１４）における増大したＤＧＬＡ生合成および蓄積（および１８：１量の減少）について述べる。Δ６デサチュラーゼ／Δ６エロンガーゼ経路またはΔ９エロンガーゼ／Δ８デサチュラーゼ経路のどちらかを通じてＤＨＡを生成するように遺伝子操作されたＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）宿主株は、Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＧＰＡＴがそこで（例えばＹ３０００株）同様に同時発現されれば、増大するＤＨＡ生合成および蓄積を実証できることが考察される。

【０６６６】

縮重ＰＣＲプライマーを使用したＭ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＧＰＡＴの同定

アスペルギルス・ニデュランス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｄｕｌａｎｓ）（ジェンバンク登録番号ＥＡＡ６２２４２）、およびニューロスポラ・クラッサ（Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ　ｃｒａｓｓａ）（ジェンバンク登録番号ＸＰ＿３２５８４０）からのＧＰＡＴ配列に基づいて、縮重ＰＣＲのために以下のプライマーをデザインした。

ＭＧＰＡＴ－Ｎ１（配列番号４０９）　ＣＣＮＣＡＹＧＣＮＡＡＹＣＡＲＴＴＹＧＴ

ＭＧＰＡＴ－ＮＲ５（配列番号４１０）　ＴＴＣＣＡＮＧＴＮＧＣＣＡＴＮＴＣＲＴＣ

［注記：配列番号４０９および４１０のために使用される核酸縮重コードは次のとおり。Ｒ＝Ａ／Ｇ、Ｙ＝Ｃ／Ｔ、およびＮ＝Ａ／Ｃ／Ｔ／Ｇ］

【０６６７】

日本国滋賀県大津市のタカラバイオからのタカラ（ＴａＫａＲａ）ＥｘＴａｑプレミクスＴａｑポリメラーゼを使用して、パーキン・エルマー（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）Ｇ

ｅｎｅＡｍｐ　９６００　ＰＣＲマシン内でＰＣＲ増幅を実施した。増幅を次のように実施した。９４℃で３０秒間の変性、５５℃で３０秒間のアニーリング、および７２℃で９０秒間の延長を３０サイクルと、それに続く７２℃で７分間の最終延長サイクル。

【０６６８】

約１．２ｋＢの断片（配列番号１４０）が得られた。この断片をキアゲン・キアクイック（Ｑｉａｇｅｎ　ＱｉａＱｕｉｃｋ）ＰＣＲ精製キットで精製し、インビトロジェン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）からのＴＯＰＯ（登録商標）クローニングベクターｐＣＲ２．１－ＴＯＰＯ中にクローンして配列決定した。翻訳すると得られた配列は、ＢＬＡＳＴプログラム分析に基づいて既知のＧＰＡＴと相同性を有した。

【０６６９】

１２１２ｂｐのｃＤＮＡ断片配列に基づいて、Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＧＰＡＴの５’および３’末端領域をＰＣＲ増幅およびゲノム歩行技術によってクローンした。これによってＭ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＧＰＡＴ（配列番号１４１）の－１０５０ｂｐ～＋２８８５ｂｐ領域に対応するコンティグのアセンブリーが可能になった。このコンティグはＧＰＡＴのコード領域全体、および４個のイントロン（配列番号１４５、１４６、１４７、および１４８）を含んだ。

【０６７０】

具体的にはＧＰＡＴの３’－末端増幅のためのテンプレートとして、実施例１６で述べられるＭ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ｃＤＮＡサンプル（１μＬ）を使用した。ＭＧＰＡＴ－５Ｎ１（配列番号４１１）およびＣＤＳＩＩＩ／３’（配列番号３９２）をプライマーとして使用した。日本国滋賀県大津市のタカラバイオからのタカラ（ＴａＫａＲａ）ＥｘＴａｑプレミクスＴａｑポリメラーゼを使用して、パーキン・エルマー（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）ＧｅｎｅＡｍｐ　９６００　ＰＣＲマシン内でＰＣＲ増幅を実施した。増幅を次のように実施した。９４℃で３０秒間の変性、５５℃で３０秒間のアニーリング、および７２℃で１２０秒間の延長を３０サイクルと、それに続く７２℃で７分間の最終延長サイクル。

【０６７１】

ＰＣＲ生成物を１：１０に希釈し、ＭＧＰＡＴ－５Ｎ２（配列番号４１２）およびＣＤＳＩＩＩ／３’をプライマーとして使用した第２回目の増幅のテンプレートとして、１μＬの希釈ＰＣＲ生成物を使用した。条件は上で述べたのと全く同じであった。第２回目のＰＣＲ生成物を１：１０に再度希釈し、ＭＧＰＡＴ－５Ｎ３（配列番号４１３）およびＣＤＳＩＩＩ／３’をプライマーとして使用した第３回目のＰＣＲのテンプレートとして、１μＬの希釈ＰＣＲ生成物を使用した。ＰＣＲ条件条件はここでも上で述べたのと全く同じであった。

【０６７２】

第３回目のＰＣＲにおいて約１ｋＢの断片が生じた。この断片をキアゲン（Ｑｉａｇｅｎ）ＰＣＲ精製キットで精製し、配列分析のためにｐＣＲ２．１－ＴＯＰＯベクター中にクローンした。配列分析からの結果は、この９６５ｂｐの断片（配列番号１４２）がＧＰＡＴ遺伝子の３’－末端に相当したことを示した。

【０６７３】

クローンテック（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）からのユニバーサル・ゲノム歩行（商標）キットを利用して、Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＧＰＡＴの５’末端領域に対応する１片のゲノムＤＮＡを得た。簡単に述べると、各２．５μｇのＭ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ゲノムＤＮＡをＤｒａＩ、ＥｃｏＲＶ、ＰｖｕＩＩまたはＳｔｕＩで個別に消化し、キアゲン（Ｑｉａｇｅｎ）キアクイック（ＱｉａＱｕｉｃｋ）ＰＣＲ精製キットを使用して、消化ＤＮＡサンプルを精製して各３０μＬのキット緩衝液ＥＢで溶出し、次に精製サンプルを下に示すようなゲノム歩行アダプター（配列番号４１４［上のストランド］および４１５［下のストランド］）にライゲートした。

【化１】

5′-GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTCGACGGCCCGGGCTGGT-3′

3′-H2N-CCCGACCA-5′

【０６７４】

各ライゲーション反応混合物は、１．９μＬの２５μＭゲノム歩行アダプター、１．６μＬの１０×ライゲーション緩衝液、０．５μＬのＴ４ＤＮＡリガーゼ、および４μＬの精製消化ゲノムＤＮＡサンプルの１つを含有した。反応混合物を１６℃で一晩インキュベートした。反応を７０℃で５分間のインキュベーションによって終結した。次に７２μＬの１０ｍＭトリスＨＣｌ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ７．４の緩衝液を各ライゲーション反応ミクスに添加した。

【０６７５】

それぞれ４つのライゲーション混合物の１つをテンプレートとして使用して、４つの別々のＰＣＲ反応を実施した。ＰＣＲ反応混合物は、１μＬのライゲーション混合物、０．５μＬの２０μＭ　ＭＧＰＡＴ－５－１Ａ（配列番号４１６）、１μＬの１０μＭキットプライマーＡＰ１（配列番号４１７）、２２．５μＬの水、およびタカラからの２５μＬのＥｘＴａｑプレミクスＴａｑ　２×ＰＣＲ溶液を含有した。ＰＣＲ反応を以下の条件を使用して３２サイクル実施した。９４℃で３０秒間の変性、５５℃で３０秒間のアニーリング、および７２℃で１８０秒間の延長。７２℃で７分間の最終延長サイクルを実施し、４℃での反応終結がそれに続いた。

【０６７６】

各ＰＣＲ反応の生成物を個々に１：５０に希釈し、第２の回目のＰＣＲテンプレートとして使用した。各反応混合物は、テンプレートとしての１μＬの希釈ＰＣＲ生成物の１つ、０．５μＬの２０μＭ　ＭＧＰＡＴ－３Ｎ１（配列番号４１８）、２１μＬの１０μＭキットプライマーＡＰ２（配列番号４１９）、２２．５μＬの水、およびタカラ（ＴａＫａＲａ）からの２５μＬのＥｘＴａｑプレミクスＴａｑ　２×ＰＣＲ溶液を含有した。上述したのと同じサーモサイクラー条件を使用して、ＰＣＲ反応を３２サイクル実施した。

【０６７７】

第２回目のＰＣＲからＤＮＡ断片を得た。この断片を精製してｐＣＲ２．１－ＴＯＰＯ中にクローンして配列決定した。配列分析は、１９０８ｂｐの断片（配列番号１４３）がＭ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＧＰＡＴ遺伝子の５’－末端であったことを示した。

【０６７８】

同様に、プライマーＭＧＰＡＴ－５Ｎ１を第１回目のＰＣＲのための遺伝子特異的プライマーとして、およびプライマーＭＧＰＡＴ－５Ｎ２を第２回目のための遺伝子特異的プライマーとして使用したこと以外は、上述のような２回のゲノム歩行から９６６ｂｐの断片（配列番号１４４）が得られた。この断片もまた精製してｐＣＲ２．１－ＴＯＰＯ中にクローンし、配列決定した。配列分析は、これがＧＰＡＴ遺伝子の一部を含有したことを示した。しかし断片は、遺伝子のどちらの端を延長するのにも、長さが足りなかった。３’ｃＤＮＡ配列（配列番号１４２）との比較は、ＯＲＦの最後の１７１ｂｐが含まれていなかったことを示した。

【０６７９】

モルティエラ・アルピナ（Ｍｏｒｔｉｅｒｅｌｌａ　ａｌｐｉｎａ）からの全長ＧＰＡＴ配列のアセンブリー

オリジナルの部分的ｃＤＮＡ断片（配列番号１４０）、３’ｃＤＮＡ断片（配列番号１４２）、内部ゲノムの断片（配列番号１４４）、および上述の５’ゲノムの断片（配列番号１４３）（図１９に示される）配列から、完全なＧＰＡＴ遺伝子（ＧＰＡＴ翻訳開始「ＡＴＧ」コドン上流に１０５０個の塩基に延びる領域、およびＧＰＡＴ終止コドンを超えて２２個の塩基に延びる領域を含んでなる）を含有する３９３５ｂｐの配列（配列番号１４１）をアセンブルした。この領域には２１５１ｂｐのＧＰＡＴ　ＯＲＦが含まれる。「

ＡＴＧ」から停止コドン「ＴＡＧ」までのＭ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＧＰＡＴ　ＯＲＦの完全なヌクレオチド配列は、配列番号１３８として提供される（配列番号１４１の塩基１０５０～２８６３に対応し、４個のイントロン（すなわち配列番号１４１の塩基１１９５～１４６９に対応するイントロン１［配列番号１４５］、配列番号１４１の塩基１５８５～１８３９に対応するイントロン２［配列番号１４６］、配列番号１４１の塩基２７９５～２８７７に対応するイントロン３［配列番号１４７］、および配列番号１４１の塩基２９４０～３０３８に対応するイントロン４［配列番号１４８］を除く）。翻訳されたアミノ酸配列（配列番号１３９）は、いくつかの真菌、植物、および動物ＧＰＡＴと相同性を示した。

【０６８０】

より具体的には、ＢＬＡＳＴ（「基礎的局在性配列検索ツール（Ｂａｓｉｃ　Ｌｏｃａｌ　Ａｌｉｇｎｍａｎｔ　Ｓｅａｒｃｈ　Ｔｏｏｌ）」アルトシュール（Ａｌｔｓｃｈｕｌ），Ｓ．Ｆ．ら著、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３～４１０頁（１９９３年））検索を実施して、配列の同一性を判定した。ここで配列番号１３９として述べられるアミノ酸断片は、トウモロコシ黒穂菌（Ｕｓｔｉｌａｇｏ　ｍａｙｄｉｓ）の推定上のＧＰＡＴのタンパク質配列（ジェンバンク登録番号ＥＡＫ８４２３７）と期待値１ｅ－１５２で４７％の同一性および６５％の類似性を有し、さらに配列番号１３９は、アスペルギルス・フミガーツス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｆｕｍｉｇａｔｕｓ）のＧＰＡＴ（ジェンバンク登録番号ＥＡＬ２００８９）と期待値１ｅ－１４２で４７％の同一性および６２％の類似性を有した。

【０６８１】

ＦＢＡＩＮ：：ＭＧＰＡＴ：：ＰＥＸ２０－３’キメラ遺伝子を含んでなるプラスミドｐＭＧＰＡＴ－１７の構築

Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＧＰＡＴ　ＯＲＦを次のようにしてクローンした。プライマーＭＧＰＡＴ－ｃＤＮＡ－５およびＭＧＰＡＴ－ｃＤＮＡ－Ｒ（配列番号４２０および４２１）を使用して、ＰＣＲによってＭ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）のｃＤＮＡからのＧＰＡＴ　ＯＲＦを増幅した。反応混合物は、１μＬのｃＤＮＡ、各１μＬのプライマー、２２μＬの水、および日本国滋賀県大津市５２０－２１９３のタカラバイオからの２５μＬのＥｘＴａｑプレミクス２×Ｔａｑ　ＰＣＲ溶液を含有した。増幅を次のように実施した。９４℃で１５０秒間の初期変性と、それに続く９４℃で３０秒間の変性、５５℃で３０秒間のアニーリング、および７２℃で１２０秒間の延長を３０サイクル。７２℃で１０分間の最終延長サイクルを実施し、４℃での反応終結がそれに続いた。ＰＣＲ反応から約２．２ｋＢのＤＮＡ断片を得た。キアゲン（Ｑｉａｇｅｎ）ＰＣＲ精製キットを使用して製造業者のプロトコルに従って、それを精製した。

【０６８２】

精製されたＰＣＲ生成物をＢａｍＨＩおよびＥｃｏＲＩで消化して、ゲルアガロース電気泳動法によって約４７０ｂｐの断片を単離し、キアゲン（Ｑｉａｇｅｎ）ゲル精製キットを使用して精製した。別に、ＰＣＲ生成物をＥｃｏＲＩおよびＮｏｔＩでも切断し、上と同様にして１．６９ｋＢの断片を単離して精製した。Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中での発現のために、遺伝子が自律複製ベクター中のＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＦＢＡＩＮプロモーターおよびＰＥＸ２０－３’ターミネーター領域の制御下にあるようにして、２つの断片をＢａｍＨＩおよびＮｏｔＩ切断ｐＺＵＦ－ＭＯＤ－１ベクター（配列番号１９２、図１８Ａ）中にライゲートした。正確な形質転換体をミニプレップＤＮＡの制限酵素分析によって確認し、得られたプラスミドを「ｐＭＧＰＡＴ－１７」（配列番号１９５、図１８Ｃ）と命名した。

【０６８３】

Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＧＰＡＴを過剰発現する形質転換体Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中の脂質組成分析

一般方法に従って、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）Ｙ２１０７Ｕ１株（実施例１４からの）をプラスミドｐＭＧＰＡＴ－１７およびプラスミドｐＺＵＦ－ＭＯＤ－

１（前出、実施例１７）でそれぞれ形質転換した。形質転換体をアミノ酸で栄養強化された合成ＭＭ中で２日間、続いてＨＧＭ中で４日間生育させた。（一般方法で述べられるような）ＧＣ分析に基づいた、ｐＺＵＦ－ＭＯＤ－１を含有する２つの形質転換体およびｐＭＧＰＡＴ－１７を含有する４つの形質転換体の脂肪酸プロフィールを下の表に示す。脂肪酸は１８：０、１８：１（オレイン酸）、１８：２（ＬＡ）、ＧＬＡ、ＤＧＬＡ、ＡＲＡ、ＥＴＡ、およびＥＰＡとして同定され、それぞれの組成は全脂肪酸の％として表される。

【０６８４】

【表５８】

表48

*M.アルピナ*GPATを過剰発現するように遺伝子操作された

*ヤロウィア*Y2107U1株の脂質組成

株	全脂肪酸							
	18:0	18:1	18:2	GLA	DGLA	ARA	ETA	EPA
Y2107U1+pZUF-MOD-1 #1	2.8	22.7	9.8	28.5	2.7	1.7	0.4	17.4
Y2107U1+pZUF-MOD-1 #2	2.5	23.4	10.3	28.7	2.5	1.5	0.3	16.8
Y2107U1+pMGPAT-17 #1	3.2	14.8	11.7	29.8	5.6	2.0	0.3	18.4
Y2107U1+pMGPAT-17 #2	2.9	16.3	11.7	28.3	6.1	1.8	0.4	16.9
Y2107U1+pMGPAT-17 #3	2.1	14.3	10.8	27.5	7.2	1.4	0.4	17.4
Y2107U1+pMGPAT-17 #4	2.7	15.7	11.5	29.1	6.3	1.7	0.4	17.3

【０６８５】

上で実証されたように、ｐＭＧＰＡＴ－１７からのＭ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＧＰＡＴの発現は％ＤＧＬＡを中の「対照」株約２．５％から６．５％に増大させた。１８：１のレベルは約２３％から約１６％に低下した。ｐＭＧＰＡＴ－１７を発現する形質転換株において天然ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＧＰＡＴがノックアウトされれば、ＤＧＬＡ（またはその他のいずれかの下流ＰＵＦＡ）の追加的増大が期待される。

【０６８６】

実施例２１

パーセントＰＵＦＡを増大させるモルティエラ・アルピナ（Ｍｏｒｔｉｅｒｅｌｌａ　ａｌｐｉｎａ）脂肪酸エロンガーゼ「ＥＬＯ３」

本実施例は、Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）$C_{16/18}$脂肪酸エロンガーゼ（「ＥＬＯ３」、配列番号８６）を同時発現するように形質転換されたヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）Ｙ２０３１株（実施例７）における、対照株と比べて３５％多いＣ１８脂肪酸（１８：０、１８：１、１８：２、およびＧＬＡ）および３１％少ないＣ１６脂肪酸について述べる。ＥＬＯ３（場合により発現増大のためにコドン最適化できる）は、所望のＰＵＦＡ、すなわちＤＨＡ生成を増大する手段として、炭素流動を遺伝子操作されたΔ６デサチュラーゼ／Δ６エロンガーゼ経路またはΔ９エロンガーゼ／Δ８デサチュラーゼ経路のどちらかに進めることができると考察される。例えばこの$C_{16/18}$脂肪酸エロンガーゼを含んでなるキメラ遺伝子を例えばＹ３０００株に容易に導入できる。

【０６８７】

Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）$C_{16/18}$脂肪酸エロンガーゼの配列の同定

Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）脂肪酸エロンガーゼ一部をコードするｃＤＮＡ断片（配列番号８８）を９，９８４個のＭ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ｃＤＮＡ配列（実施例１６）から同定した。この断片はいくつかの脂肪酸エロンガーゼと顕著な相同性を持ち、した

がってエロンガーゼと仮に同定された。

【０６８８】

それに対して配列番号８８が最も高い類似性を有する配列を要約するＢＬＡＳＴ比較の結果を、％同一性、％類似性、および期待値に従って報告する。具体的には翻訳された配列番号８８のアミノ酸配列が、カンジダ・アルビカンス（Ｃａｎｄｉｄａ　ａｌｂｉｃａｎｓ）ＳＣ５３１４（ジェンバンク登録番号ＥＡＬ０４５１０．１、そこでＳ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）ＥＵＲ４、ＦＥＮ１、およびＥＬＯ１と類似した３つの有望な脂肪酸エロンガーゼ遺伝子の１つとして注釈される）からの有望な脂肪酸エロンガーゼのタンパク質配列と、期待値４ｅ－１３で３２％の同一性および４６％の類似性を有した。さらに配列番号８８は、サッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）（ジェンバンク登録番号ＮＣ＿００１１４２、染色体Ｘの塩基６７８４９～６８７８１）からのＥＬＯ１と３５％の同一性および５３％の類似性を有した。Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）ＥＬＯ１は、不飽和Ｃ１２～Ｃ１６脂肪酸アシルＣｏＡｓからＣ１６～Ｃ１８脂肪酸へのカルボキシ終末延長を触媒する、中鎖アシルエロンガーゼとして述べられる。

【０６８９】

上で報告される相同性に基づいて、配列番号８８のヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）遺伝子産物をここで「エロンガーゼ３」または「ＥＬＯ３」と命名する。

【０６９０】

部分的脂肪酸エロンガーゼｃＤＮＡ配列（配列番号８８）の分析は、５’および３’－末端がどちらも不完全であることを示唆した。Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＥＬＯ３の失われた３’領域を得るために、（実施例２０で述べられるようにして）クローンテック（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）ユニバーサル・ゲノムウォーカー（商標）キットを使用した。具体的には、プライマーとしてＭＡ　Ｅｌｏｎｇ　３’１（配列番号４２２）およびＡＰ１を使用した（すなわちプライマーＭＧＰＡＴ－５－１ＡおよびＡＰ１の代わりに）こと以外は、前述したのと同じ構成要素および条件を使用して、同一の４つのライゲーション混合物セットを第１回目のＰＣＲのために使用した。第２回目のＰＣＲは、プライマーとしてＭＡ　Ｅｌｏｎｇ　３’２（配列番号４２３）およびＡＰ２を使用した。第２回目のＰＣＲから１０４２ｂｐのＤＮＡ断片が得られた（配列番号８９）。この断片を精製し、ｐＣＲ２．１－ＴＯＰＯ中にクローンして配列決定した。配列分析は、断片が遺伝子の「ＴＡＡ」停止コドンの約６４０ｂｐの下流を含むＥＬＯ３の３’－末端を含有したことを示した。

【０６９１】

クローンテック（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）３’－末端ＲＡＣＥ（前出）で使用したのと同一の４つのライゲーション混合物セットをＭ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＥＬＯ３の５’－末端領域を得るためにも使用した。具体的には、プライマーとしてＭＡ　Ｅｌｏｎｇ　５’１（配列番号４２４、５’末端で入れ子）およびＡＰ１を使用した（すなわちプライマーＭＡ　Ｅｌｏｎｇ　３’１およびＡＰ１の代わりに）こと以外は、上述したのと同じ構成要素および条件を使用して、第１回目のＰＣＲを実施した。第２回目のＰＣＲは、プライマーとしてＭＡ　Ｅｌｏｎｇ　５’２（配列番号４２５、５’末端で入れ子）およびＡＰ２を使用した。２２２３ｂｐのＤＮＡ断片（配列番号９０）を得た。これを精製し、ｐＣＲ２．１－ＴＯＰＯ中にクローンして配列決定した。配列分析は、これがＥＬＯ３遺伝子の５’－領域を含有したことを示した。

【０６９２】

したがってオリジナルの部分的ｃＤＮＡ配列（配列番号８８）と、ゲノム歩行によって得られた重複５’および３’配列（それぞれ配列番号９０および８９、図２０に示す）とを組み合わせて、Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＥＬＯ３（配列番号９１）のｃＤＮＡ配列全体を得た。これはＥＬＯ３の推定上の「ＡＴＧ」翻訳開始コドンの２０９１ｂｐ上流、８２８ｂｐのＥＬＯ３　ＯＲＦ（すなわち配列番号６６、配列番号９１の塩基２０９２

～２９１９に対応する）、およびＥＬＯ３停止コドンの６３８ｂｐ下流（配列番号９１の塩基２９２０～３５５７に対応する）を含んでなる、ここで配列番号９１として同定された３５５７ｂｐの配列を生じた。

【０６９３】

Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＥＬＯ３の対応ゲノムの配列は、配列番号９１として提供されるｃＤＮＡ断片よりも長い。具体的にはＯＲＦの３１８ｂｐにＥＬＯ３遺伝子を含有するゲノムＤＮＡ中に、５４２ｂｐのイントロン（配列番号９２）が見いだされた。したがってここで配列番号９３として提供されるゲノムＤＮＡ断片は４，０９９ｂｐである（図２０）。

【０６９４】

翻訳されたＥＬＯ３タンパク質配列（配列番号８７）は、ＢＬＡＳＴプログラム分析に基づいて以下の相同性を有した。カンジダ・アルビカンス（Ｃａｎｄｉｄａ　ａｌｂｉｃａｎｓ）ＳＣ５３１４からの有望な脂肪酸エロンガーゼ（ジェンバンク登録番号ＥＡＬ０４５１０．１）と、期待値４ｅ－４３で３７％の同一性および５１％の類似性。さらに翻訳されたＥＬＯ３は、ニューロスポラ・クラッサ（Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ　ｃｒａｓｓａ）からのタンパク質配列ＸＰ＿３３１３６８（そこで「仮説的タンパク質」として注釈される）と、期待値３ｅ－４４で、３３％の同一性および４４％の類似性を共有した。

【０６９５】

ＦＢＡＩＮ：：ＥＬＯ３：：ＰＥＸ１６－３’キメラ遺伝子を含んでなるプラスミドｐＺＵＦ６Ｓ－Ｅ３ＷＴの構築

Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）脂肪酸ＥＬＯ３　ＯＲＦを次のようにしてクローンした。プライマーＭＡ　Ｅｌｏｎｇ　５’　ＮｃｏＩ　３およびＭＡ　Ｅｌｏｎｇ　３’　ＮｏｔＩ（配列番号４２６および４２７）を使用して、ＰＣＲによってＭ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）のｃＤＮＡ（実施例１６）からＥＬＯ３　ＯＲＦを増幅した。反応混合物は、１μＬのｃＤＮＡ、各１μＬのプライマー、２２μＬの水、およびタカラ（ＴａＫａＲａ）からの２５μＬのＥｘＴａｑプレミクス２×Ｔａｑ　ＰＣＲ溶液を含有した。増幅を次のように実施した。９４℃で３０秒間の初期変性と、それに続く９４℃で３０秒間の変性、５５℃で３０秒間のアニーリング、および７２℃で１２０秒間の延長を３２サイクル。７２℃で７分間の最終延長サイクルを実施して、それに４℃での反応終結が続いた。ＰＣＲ反応から約８３０ｂｐのＤＮＡ断片を得た。それをカリフォルニア州バレンシアのキアゲン（Ｑｉａｇｅｎ（Ｖａｌｅｎｃｉａ，ＣＡ））からのＰＣＲ精製キットを使用して、製造業者のプロトコルに従って精製した。精製されたＰＣＲ生成物を２つのアリコートに分割し、１つをＮｃｏＩおよびＮｓｐＩで、もう１つをＮｓｐＩおよびＮｏｔＩで消化した。Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）における発現のために、遺伝子が自律複製ベクター中でＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＦＢＡＩＮプロモーターおよびＰＥＸ１６－３’ターミネーター領域（ジェンバンク登録番号Ｕ７５４３３）の制御下にあるようにして、三点ライゲーションによって、約２７０ｂｐのＮｃｏＩ－ＮｓｐＩおよび約５６０ｂｐのＮｓｐＩ－ＮｏｔＩ断片をＮｃｏ　Ｉ－Ｎｏｔ　Ｉ切断ｐＺＦ５Ｔ－ＰＰＣベクター中にクローンした（図１３Ｂ、配列番号１７０）。正確な形質転換体をミニプレップ分析によって確認し、得られたプラスミドを「ｐＺＦ５Ｔ－ＰＰＣ－Ｅ３」（配列番号１９６）と命名した。

【０６９６】

プラスミドｐＺＦ５Ｔ－ＰＰＣ－Ｅ３をＣｌａＩおよびＰａｃＩで消化し、キアゲン（Ｑｉａｇｅｎ）ゲル抽出キット使用して、アガロースゲルから約２．２ｋＢのバンド（すなわちＦＢＡＩＮ：：ＥＬＯ３：：ＰＥＸ１６－３’断片）を精製した。断片をＦＢＡＩＮプロモーター制御下にあるモルティエラ・アルピナ（Ｍｏｒｔｉｅｒｅｌｌａ　ａｌｐｉｎａ）Δ６デサチュラーゼＯＲＦ（「Ｄ６Ｓ」、ジェンバンク登録番号ＡＦ４６５２８１）を含有する自律複製プラスミドであるＣｌａＩ－ＰａｃＩ切断ｐＺＵＦ６Ｓ中に、Ｐｅｘ２０－３’ターミネーター（すなわちＦＢＡＩＮ：：Ｄ６Ｓ：：Ｐｅｘ２０キメラ遺伝子）およびＵｒａ３遺伝子と共にクローンした（図２１Ａ、配列番号１９７）。正確な

形質転換体をミニプレップ分析によって確認し、得られたプラスミドを「ｐＺＵＦ６Ｓ－Ｅ３ＷＴ」（図２１Ｂ、配列番号１９８）と命名した。

【０６９７】

Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＥＬＯ３を過剰発現する形質転換Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中の脂質組成の分析

一般方法に従って、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）Ｙ２０３１株（実施例７）をプラスミドｐＺＵＦ６Ｓ（対照、ＦＢＡＩＮ：：Ｄ６Ｓ：：Ｐｅｘ２０キメラ遺伝子を含んでなる）およびプラスミドｐＺＵＦ６Ｓ－Ｅ３ＷＴ（ＦＢＡＩＮ：：Ｄ６Ｓ：：Ｐｅｘ２０キメラ遺伝子およびＦＢＡＩＮ：：ＥＬＯ３：：ＰＥＸ１６キメラ遺伝子を含んでなる）で形質転換した。形質転換体をアミノ酸で栄養強化された合成ＭＭ中で２日間、続いてＨＧＭ中で４日間生育させた。（一般方法で述べられるような）ＧＣ分析に基づいて、ｐＺＵＦ６Ｓを含有する６個のクローン（単一形質転換からのクローン＃１～６）、およびｐＺＵＦ６Ｓ－Ｅ３ＷＴを含有する２２個のクローン（４つの異なる形質転換［すなわち＃３、５、６、および７］からの）の脂肪酸プロフィールを下の表４９に示す。脂肪酸を１６：０（パルミチン酸）、１６：１（パルミトレイン酸）、１８：０、１８：１（オレイン酸）、１８：２（ＬＡ）、およびＧＬＡとして同定し、それぞれの組成は全脂肪酸の％として表される。

【０６９８】

【表５９】

表49
*M.アルピナ*ELO3を過剰発現するように遺伝子操作された
*ヤロウィア*Y2031株の脂質組成

***Y.リポリティカ*Y2031株形質転換体および/またはクローン番号**	**脂肪酸組成（全脂肪酸の%）**					
	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	GLA
pZUF6S #1（対照）	9.0	23.2	1.2	38.2	19.8	6.9
pZUF6S #2（対照）	10.1	23.4	1.4	39.0	17.5	7.1
pZUF6S #3（対照）	9.7	22.7	1.4	39.0	20.2	7.0
pZUF6S #4（対照）	8.5	24.1	0.0	40.8	19.8	6.9
pZUF6S #5（対照）	9.8	22.4	1.7	39.1	20.2	6.8
pZUF6S #6（対照）	9.1	22.7	1.9	39.9	19.7	6.6
pZUF6S-E3WT #3-1	8.9	17.3	4.1	36.5	21.6	11.6
pZUF6S-E3WT #3-2	8.8	17.8	3.7	36.9	21.3	11.5
pZUF6S-E3WT #3-3	***8.9***	***18.3***	***3.5***	***33.8***	***35.4***	***0.0***
pZUF6S-E3WT #3-6	8.5	19.9	4.4	37.8	17.1	12.3
pZUF6S-E3WT #5-1	8.6	17.6	4.0	37.6	21.1	11.1
pZUF6S-E3WT #5-2	8.8	17.1	3.9	37.6	21.3	11.2
pZUF6S-E3WT #5-3	9.1	17.1	3.5	37.6	21.5	11.1
pZUF6S-E3WT #5-4	8.8	17.9	4.3	38.0	19.3	11.7
pZUF6S-E3WT #5-5	9.2	16.1	4.4	37.0	21.6	11.7
pZUF6S-E3WT #5-6	***8.7***	***21.5***	***4.2***	***30.3***	***35.3***	***0.0***
pZUF6S-E3WT #6-1	9.4	16.9	4.6	36.6	21.5	11.0
pZUF6S-E3WT #6-2	9.8	16.2	4.1	36.5	21.9	11.6
pZUF6S-E3WT #6-3	9.4	17.0	4.4	36.2	21.8	11.3
pZUF6S-E3WT #6-4	8.3	16.6	4.2	36.9	21.9	12.2
pZUF6S-E3WT #6-5	8.8	18.5	5.5	36.0	17.8	13.4
pZUF6S-E3WT #6-6	8.7	19.5	5.2	35.4	18.1	13.2
pZUF6S-E3WT #7-1	***0.0***	***30.6***	***0.0***	***35.5***	***18.2***	***15.8***
pZUF6S-E3WT #7-2	8.0	17.7	4.0	37.7	20.9	11.7
pZUF6S-E3WT #7-3	***0.0***	***26.7***	***4.2***	***36.0***	***21.4***	***11.7***
pZUF6S-E3WT #7-4	***0.0***	***28.1***	***4.3***	***37.0***	***16.9***	***13.6***
pZUF6S-E3WT #7-5	8.3	17.0	4.7	36.7	21.2	12.1
pZUF6S-E3WT #7-6	8.0	18.0	4.8	36.3	20.8	12.1

【０６９９】

サンプルのいくつか（斜体の太字でラベルした）は、期待される読み取りから外れていた。具体的にはＹ２０３１＋ｐＺＵＦ６Ｓ－Ｅ３ＷＴ＃３－３またはＹ２０３１＋ｐＺＵＦ６Ｓ－Ｅ３ＷＴ＃５－６のいずれもＧＬＡを生成しなかった。同様にＹ２０３１＋ｐＺＵＦ６Ｓ－Ｅ３ＷＴ＃７－１、＃７－３、および＃７－４はＧＣエラーを有し、１６：０および１６：１のピークがＧＣによって単一ピークとして読み取られた。これらの様々な結果を受けて、表５０は、対照およびＥＬＯ３を発現する形質転換体株中の平均脂質を報告する。具体的には表５０は表４９中の脂肪酸プロフィールからの平均を示すが、表４９中で不正確であるとして斜体の太字で示唆した行は、これらの平均を計算する際に含めなかった。「全Ｃ１６」が１６：０および１６：１の平均面積の合計を表すのに対し、「全Ｃ１８」は１８：０、１８：１、１８：２、およびＧＬＡの平均面積の合計を反映する。

【０７００】
【表６０】

表50
*M.アルピナ*ELO3を過剰発現するように遺伝子操作された
*ヤロウィア*Y2031株の平均脂質組成

*Y.リポリティカ*Y2031株形質転換体	平均脂肪酸組成（全脂肪酸の%）						全C16	全C18
	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	GLA		
pZUF6S（対照）	9.4	23.1	1.3	39.3	19.5	6.9	32.4	67.1
pZUF6S-E3WT #3	8.7	18.3	4.1	37.1	20.0	11.8	27.0	73.0
pZUF6S-E3WT #5	8.9	17.2	4.0	37.6	21.0	11.4	26.1	73.9
pZUF6S-E3WT #6	9.1	17.5	4.6	36.3	20.5	12.1	26.5	73.5
pZUF6S-E3WT #7	8.1	17.6	4.5	36.9	21.0	12.0	25.6	74.4

【０７０１】
上で報告されるデータに基づいて、Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＥＬＯ３の過剰発現は、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）Ｙ２０３１株中でＭ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）Δ６デサチュラーゼと同時発現すると、Ｍ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）Δ６デサチュラーゼのみを過剰発現するＹ２０３１対照株と比べて、Ｃ１８の百分率増大およびＣ１６の百分率低下をもたらした。これはＭ．アルピナ（ａｌｐｉｎａ）ＥＬＯ３が、確かに$C_{16/18}$脂肪酸エロンガーゼであったことを示唆した。

【０７０２】
実施例２２
パーセントＰＵＦＡを増大させるヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）$C_{16/18}$脂肪酸エロンガーゼ「ＹＥ２」
本実施例は、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）$C_{16/18}$脂肪酸エロンガーゼ（「ＹＥ２」、配列番号９４）を同時発現するように形質転換されたヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）Ｙ２０３１株（実施例７）における、増大するＧＬＡ生合成および蓄積について述べる。ＹＥ２エロンガーゼは、所望のＰＵＦＡ、すなわちＤＨＡ生成を増大する手段として、炭素流動を遺伝子操作されたΔ６デサチュラーゼ／Δ６エロンガーゼ経路またはΔ９エロンガーゼ／Δ８デサチュラーゼ経路のどちらかに進めることができると考察される。例えばこの$C_{16/18}$脂肪酸エロンガーゼを含んでなるキメラ遺伝子は、例えばＹ３０００株中に容易に導入される。

【０７０３】
ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）$C_{16/18}$脂肪酸エロンガーゼ配列の同定
クエリー配列としてラットＥｌｏ２$C_{16/18}$脂肪酸エロンガーゼタンパク質配列（ジェンバンク登録番号ＡＢ０７１９８６、配列番号８４）を使用して、アラインメントによってＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）からの新規脂肪酸エロンガーゼ候補を同定した。具体的にはこのｒＥｌｏ２クエリー配列を使用して、ジェンバンクおよび「酵母菌プロジェクト・ジェノレビュール（Ｇｅｎｏｌｅｖｕｒｅｓ）」（バイオインフォマティクス・センター、ＬａＢＲＩ、フランス国タランスセデックス（Ｔａｌｅｎｃｅ　Ｃｅｄｅｘ））の公共Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）タンパク質データベースを検索した（ドゥジョン（Ｄｕｊｏｎ），Ｂ．ら著、Ｎａｔｕｒｅ　４３０（６９９５）：３５～４４頁（２００４年）も参照されたい）。これは相同配列であるジェンバンク登録番号ＣＡＧ７７９０１（配列番号９４および９５、「無名タンパク質生成物」と注釈される）の同定をもたらした。この遺伝子をＹＥ２と命名した。

【０７０４】
ＢＬＡＳＴアルゴリズム（アルトシュール（Ａｌｔｓｃｈｕｌ），Ｓ．Ｆ．ら著、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３８９～３４０２頁（１９９７年））を使用した、ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）ＹＥ２アミノ酸配列と公共データベースとの比較は、最もよく似ている既知のアミノ酸配列が、有望な脂肪酸エロンガーゼとして注釈されるカンジダ・アルビカンス（Ｃａｎｄｉｄａ ａｌｂｉｃａｎｓ）ＳＣ５３１４（配列番号９６、ジェンバンク登録番号ＥＡＬ０４５１０）からのものであることを明らかにした。タンパク質は約４０％の同一性を共有し、７ｅ－６１のＥ値で２３６をスコアした。
【０７０５】
ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）ＹＥ２遺伝子の単離
テンプレートとしてヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）ゲノムＤＮＡを、およびプライマーとしてオリゴヌクレオチドＹＬ５９７およびＹＬ５９８（配列番号４２８および４２９）を使用して、ＹＥ２遺伝子のコード領域をＰＣＲによって増幅した。一般方法で述べられるようにして、ＰＣＲ反応を５０μＬの全容積で実施した。サーモサイクラー条件を次のように設定した。９５℃で１分間、５６℃で３０秒間、７２℃で１分間を３５サイクルと、それに続く７２℃で１０分間の最終延長。ＹＥ２コード領域のＰＣＲ生成物を精製してＮｃｏＩ／ＮｏｔＩで消化し、次にＮｃｏＩ／ＮｏｔＩ消化ｐＺＫＵＧＰＹＥ１－Ｎとライゲートして（下記の実施例２３、図２１Ｃの配列番号１９９も参照されたい）、ｐＺＫＵＧＰＹＥ２（図２１Ｄ、配列番号２００）を生じさせた。「ＡＴＧ」翻訳開始コドン周辺へのＮｃｏＩ部位の添加は、ＹＥ２の第２のアミノ酸をＬからＶに変化させた。
【０７０６】
ｐＺＫＵＧＰＹＥ２のＣｌａＩ／ＮｏｔＩ断片（ＧＰＡＴプロモーターおよびＹＥ２コード領域を含有する）およびＡｃｏターミネーターを含有するＮｏｔＩ／ＰａｃＩ断片（ＡＣＯ３’ターミネーターをプライマーＹＬ３２５およびＹＬ３２６［配列番号４３０および４３１］で増幅し次にＮｏｔＩ／ＰａｃＩで消化して、ＰＣＲによって調製された）をＣｌａＩ／ＰａｃＩ消化ベクターｐＺＵＦ６Ｓと一方向性にライゲートし、ｐＺＵＦ６ＹＥ２を生成した。ｐＺＫＵＴ１６のＣｌａＩ／ＮｃｏＩ断片（ＴＥＦプロモーターを含有する）およびｐＺＵＦ６ＹＥ２のＮｃｏＩ／ＰａｃＩ断片（ＹＥ２のコード領域およびＡｃｏターミネーターを含有する）を引き続いてＣｌａＩ／ＰａｃＩ消化ベクターｐＺＵＦ６Ｓと一方向性にライゲートし、ｐＺＵＦ６ＴＹＥ２（配列番号２０１）を生成した。
【０７０７】
ＹＥ２を過剰発現する形質転換Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中の脂質組成の分析
プラスミドｐＺＵＦ６Ｓ（図２１Ａ、配列番号１９７）およびｐＺＵＦ６ＴＹＥ２（配列番号２０１）を使用して、ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）Ｙ２０３１株を別々に形質転換した。これらの２つのプラスミドの構成要素については、表５１および５２で述べられる。
【０７０８】

【表６１】

表51
プラスミドpZUF6S（配列番号197）の説明

配列番号197内のRE部位およびヌクレオチド	断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明
EcoRI/ClaI（3114～4510）	*ヤロウィア*自律複製配列18（ARS18、ジェンバンク登録番号M91600）
Sall/PacI（6022～4530）	*ヤロウィア*Ura3遺伝子（ジェンバンク登録番号AJ306421）
EcoRI/BsiWI（6063～318）	以下を含んでなるFBAIN::Δ6S::Pex20 ● FBAIN:FBAINプロモーター（配列番号214） ● Δ6S:*モルティエラ・アルピナ*由来コドン最適化Δ6デサチュラーゼ遺伝子（配列番号3）、（ジェンバンク登録番号AF465281） ● Pex20:*ヤロウィア*Pex20遺伝子からのPex20ターミネーター配列（ジェンバンク登録番号AF054613）

【０７０９】
【表６２】

表52
プラスミドpZUF6TYE2（配列番号201）の説明

配列番号201内のRE部位およびヌクレオチド	断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明
EcoRI/ClaI（7461～8857）	*ヤロウィア*自律複製配列18（ARS18、ジェンバンク登録番号M91600）
Sall/PacI（1907～415）	*ヤロウィア*Ura3遺伝子（ジェンバンク登録番号AJ306421）
EcoRI/BsiWI（1948～4665）	pZUF6（前出）について述べられるのと同様のFBAIN::Δ6S::Pex20
ClaI/PacI（8857～415）	以下を含んでなるTEF::YE2::Aco ● TEF:TEFプロモーター（ジェンバンク登録番号AF054508） ● YE2:*ヤロウィア*YE2遺伝子のコード領域（配列番号74、ジェンバンク登録番号CAG77901） ● Aco:*ヤロウィア*Aco3遺伝子のターミネーター配列（ジェンバンク登録番号AJ001301）

【０７１０】
一般方法に従って、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）Ｙ２０３１株（実施例７）をプラスミドｐＺＵＦ６Ｓ（対照）およびプラスミドｐＺＵＦ６ＴＹＥ２で形質転換した。形質転換体を液体ＭＭ中で２日間生育させた。（一般方法で述べられるような）ＧＣ分析に基づいた、ｐＺＵＦ６ＳまたはｐＺＵＦ６ＹＥ２をそれぞれ含有する８個のコロ

ニーの脂肪酸プロフィールを下の表５３に示す。脂肪酸は、１６：０（パルミチン酸）、１６：１（パルミトレイン酸）、１８：０、１８：１（オレイン酸）、１８：２（ＬＡ）、およびＧＬＡと同定され、それぞれの組成は全脂肪酸の％として表される。

【０７１１】

【表６３】

表53

pZUF6SおよびpZUF6TYE2で形質転換された

*ヤロウィア*Y2031株の脂肪酸組成の比較

Y.リポリティカ	**脂肪酸組成（全脂肪酸の%）**					
Y2031株形質転換体	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	GLA
pZUF6S #1（対照）	15.4	13.8	2.5	34.1	16.8	8.3
pZUF6S #2（対照）	15.2	12.8	3.0	36.5	16.4	8.3
pZUF6S #3（対照）	15.1	12.2	3.2	36.5	17.1	8.5
pZUF6S #4（対照）	15.2	12.8	3.1	36.3	16.6	8.4
pZUF6S #5（対照）	14.9	10.9	3.6	37.4	18.0	8.7
pZUF6S #6（対照）	14.8	10.1	4.2	37.6	18.7	8.6
pZUF6S #7（対照）	14.7	11.9	3.0	36.0	17.8	9.1
pZUF6S #8（対照）	14.9	12.6	2.9	35.9	17.3	8.8
平均	**15.0**	**12.1**	**3.2**	**36.3**	**17.3**	**8.6**
pZUF6TYE2 #1	13.1	8.4	4.4	42.4	16.8	9.7
pZUF6TYE2 #2	13.1	7.6	5.3	40.8	18.6	9.8
pZUF6TYE2 #3	13.5	8.1	4.6	39.2	19.0	10.6
pZUF6TYE2 #4	13.4	7.4	5.7	39.9	18.7	9.8
pZUF6TYE2 #5	13.4	8.4	5.5	45.2	14.3	7.6
pZUF6TYE2 #6	13.4	7.4	5.5	39.3	19.2	10.5
pZUF6TYE2 #7	13.4	8.6	4.4	40.6	17.9	9.9
pZUF6TYE2 #8	13.2	7.5	5.4	41.2	18.0	9.7
平均	**13.3**	**8.0**	**5.0**	**41.1**	**17.8**	**9.7**

【０７１２】

ＧＣ分析は、ｐＺＵＦ６ＳによるＹ２０３１形質転換体中で、全脂質の約２７．１％のＣ１６（Ｃ１６：０およびＣ１６：１）および６２．２％のＣ１８（Ｃ１８：０、Ｃ１８：１、Ｃ１８：２およびＧＬＡ）が生成し、ｐＺＵＦ６ＴＹＥ２によるＹ２０３１形質転換体中で、約２１．３％のＣ１６および７３．６％のＣ１８が生成したことを示した。したがってｐＺＵＦ６ＴＹＥ２形質転換体中ではＣ１６の総量が約２１．４％低下し、Ｃ１８の総量は約１８％増大した（ｐＺＵＦ６Ｓでの形質転換体と比較して）。これらのデータは、ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）中でＹＥ２が$C_{16/18}$脂肪酸エロンガーゼとして機能して、Ｃ１８脂肪酸を生成することを実証した。さらにｐＺＵＦ６Ｓ形質転換体中で生成したＧＬＡに比べて、ｐＺＵＦ６ＴＹＥ２形質転換体中では約１２．８％より多くのＧＬＡが生成した。これらのデータは、ＹＥ２エロンガーゼが炭素流動を遺伝子操作されたＰＵＦＡ経路に進めて、より多くの最終生成物（すなわちＧＬＡ）を生成できることを提案した。

【０７１３】

実施例２３

パーセントＰＵＦＡを増大させるヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）$C_{14/16}$脂肪酸エ

ロンガーゼ「ＹＥ１」

本実施例は、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）$C_{14/16}$脂肪酸エロンガーゼ（「ＹＥ１」、配列番号９７）を同時発現するように形質転換された、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）Ｙ２０３１株（実施例７）中の増大するＧＬＡ生合成および蓄積について述べる。ＹＥ１エロンガーゼは、所望のＰＵＦＡ、すなわちＤＨＡ生成を増大する手段として、炭素流動を遺伝子操作されたΔ６デサチュラーゼ／Δ６エロンガーゼ経路またはΔ９エロンガーゼ／Δ８デサチュラーゼ経路のどちらかに進めることができると考察される。具体的には、この$C_{14/16}$脂肪酸エロンガーゼ含んでなるキメラ遺伝子を例えばＹ３０００株中に容易に導入できる。

【０７１４】

ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）$C_{14/16}$脂肪酸エロンガーゼ配列の同定

実施例２２で使用したと同様の様式で、クエリー配列としてラットＥｌｏ２$C_{16/18}$脂肪酸エロンガーゼタンパク質配列（ジェンバンク登録番号ＡＢ０７１９８６、配列番号８４）を使用して、アラインメントによって、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）からの新規脂肪酸エロンガーゼ候補を同定した。これは相同配列であるジェンバンク登録番号ＣＡＧ８３３７８（配列番号９７および９８、「無名タンパク質生成物」と注釈される）の同定をもたらした。この遺伝子を「ＹＥ１」と命名した。

【０７１５】

ＢＬＡＳＴアルゴリズム（アルトシュール（Ａｌｔｓｃｈｕｌ），Ｓ．Ｆ．ら著、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２５：３３８９～３４０２頁（１９９７年））を使用した、ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）ＹＥ１アミノ酸配列と公共データベースとの比較は、最もよく似ている既知の配列が、有望な脂肪酸エロンガーゼであり、ＹＥ１と約６０％の同一性を共有するニューロスポラ・クラッサ（Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ　ｃｒａｓｓａ）（ジェンバンク登録番号ＣＡＤ７０９１８、配列番号９９）からのＦＥＮ１であることを明らかにした。

【０７１６】

ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）ＹＥ１遺伝子の単離

ＹＥ１遺伝子（配列番号９７）のＤＮＡ配列は、内部ＮｃｏＩ部位を有する。ＹＥ１遺伝子の「ＡＴＧ」翻訳開始コドン周辺にヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）翻訳モチーフを組み込むために、二段階ストラテジーを用いて、ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）からのＹＥ１遺伝子全体をＰＣＲした。具体的にはテンプレートとしてヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）ゲノムＤＮＡを使用して、プライマーとしてオリゴヌクレオチドＹＬ５６７およびＹＬ５６８（配列番号４３２および４３３）を使用して、ＹＥ１の最初の半分をＰＣＲによって増幅する一方、ＹＥ１遺伝子の残り半分は、プライマーとしてオリゴヌクレオチドＹＬ５６９およびＹＬ５７０（配列番号４３４および４３５）を使用して、同様に増幅した。一般方法で述べられるようにして、ＰＣＲ反応を５０μＬの全容積で実施した。サーモサイクラー条件を次のように設定した。９５℃で１分間、５６℃で３０秒間、７２℃で１分間を３５サイクルと、それに続く７２℃で１０分間の最終延長。ＹＥ１の５’部分に対応するＰＣＲ生成物を精製し、次にＮｃｏＩおよびＳａｃＩで消化してＹＥ１－１断片を生じさせる一方、ＹＥ１の３’部分のＰＣＲ生成物を精製し、ＳａｃＩおよびＮｏｔＩで消化してＹＥ１－２断片を生じさせた。ＹＥ１－１およびＹＥ１－２断片をＮｃｏＩ／ＮｏｔＩ消化ｐＺＫＵＧＰＥ１Ｓ（前出、実施例１４）と直接ライゲートして、ｐＺＫＵＧＰＹＥ１（図２２Ａ、配列番号２０２）を生じさせた。次にテンプレートとしてｐＺＫＵＧＰＹＥ１、およびプライマーとしてオリゴヌクレオチドＹＬ５７１およびＹＬ５７２（配列番号４３６および４３７）を使用して、ＹＥ１の内部ＮｃｏＩ部位を部位特異的変異誘発によって変異させ、ｐＺＫＵＧＰＹＥ１－Ｎ（配列番号１９９）を生じさせた。配列分析は、突然変異がＹＥ１のアミノ酸配列を変化させなかったことを示した。ＡＴＧ翻訳開始コドン周辺へのＮｃｏＩ部位の添加は、ＹＥ１の第２のアミノ酸をＳからＡに変

化させた。

【０７１７】

ｐＺＦ５Ｔ－ＰＰＣのＣｌａＩ／ＮｃｏＩ断片（ＦＢＡＩＮプロモーターを含有する）およびｐＺＫＵＧＰＹＥ１－ＮのＮｃｏＩ／ＰａｃＩ断片（ＹＥ１のコード領域およびＡｃｏターミネーターを含有する）をＣｌａＩ／ＰａｃＩ消化ベクターｐＺＵＦ６Ｓと一方向性にライゲートして、ｐＺＵＦ６ＦＹＥ１（配列番号２０３）を生成した。

【０７１８】

ＹＥ１を過剰発現する形質転換体Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中の脂質組成の分析

一般方法に従って、プラスミドｐＺＵＦ６ＳおよびｐＺＵＦ６ＦＹＥ１（配列番号２０３）を使用して、ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）Ｙ２０３１株（実施例７から）を別々に形質転換した。対照プラスミドｐＺＵＦ６Ｓ（図２１Ａ、配列番号１９７、ＦＢＡＩＮ：：Ｄ６Ｓ：：Ｐｅｘ２０キメラ遺伝子を含んでなる）の構成要素については実施例２２で述べられる。ｐＺＵＦ６ＦＹＥ１の構成要素（図２２Ｂ、配列番号２０３、ＦＢＡＩＮ：：Ｄ６Ｓ：：Ｐｅｘ２０キメラ遺伝子およびＦＢＡＩＮ：：ＹＥ１：：Ａｃｏキメラ遺伝子を含んでなる）については、下の表５４で述べられる。

【０７１９】

【表６４】

表54

プラスミドpZUF6FYE1（配列番号203）の説明

配列番号203内のRE部位およびヌクレオチド	断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明
EcoRI/ClaI（7047～8445）	*ヤロウィア* 自律複製配列18（ARS18、ジェンバンク登録番号M91600）
Sall/PacI（1493～1）	*ヤロウィア*Ura3遺伝子（ジェンバンク登録番号AJ306421）
EcoRI/BsiWI（1534～4251）	pZUF6（前出、実施例22）について述べられるのと同様のFBAIN::Δ6S::Pex20
ClaI/PacI（8443～1）	以下を含んでなるFBAIN::YE1::Aco ● FBAIN：FBAINプロモーター（配列番号214） ● YE1：*ヤロウィア*YE1遺伝子のコード領域（配列番号97、ジェンバンク登録番号CAG83378） ● Aco：*ヤロウィア*Aco3遺伝子からのAco3ターミネーター配列（ジェンバンク登録番号AJ001301）

【０７２０】

形質転換に続いて、形質転換体をアミノ酸で栄養強化された合成ＭＭ中で２日間、続いてＨＧＭ中で４日間生育させた。（一般方法で述べられるような）ＧＣ分析に基づいた、ｐＺＵＦ６Ｓを含有する６個のクローン、およびｐＺＵＦ６ＦＹＥ１を含有する５個のクローンの脂肪酸プロフィールを下の表５５に示す。脂肪酸は、１６：０（パルミチン酸）、１６：１（パルミトレイン酸）、１８：０、１８：１（オレイン酸）、１８：２（ＬＡ）、およびＧＬＡとして同定され、それぞれの組成は全脂肪酸の％として表される。

【０７２１】

【表６５】

表55
pZUF6SおよびpZUF6FYE1で形質転換した
*ヤロウィア*Y2031株脂肪酸組成の比較

形質転換体	脂肪酸組成（全脂肪酸の%）				
	16:0	16:1	18:1	18:2	GLA
pZUF6S #1（対照）	12.9	18.2	29.6	23.5	10.7
pZUF6S #2（対照）	12.6	18.6	29.6	23.8	10.3
pZUF6S #3（対照）	13.0	17.8	29.8	23.9	10.6
pZUF6S #4（対照）	13.1	18.9	30.1	22.3	10.3
pZUF6S #5（対照）	13.0	17.8	29.6	23.4	10.9
pZUF6S #6（対照）	12.0	18.7	30.4	23.2	10.4
平均	**12.8**	**18.3**	**29.9**	**23.4**	**10.5**
pZUF6FYE1 #1	17.4	21.9	20.4	19.2	16.9
pZUF6FYE1 #2	16.7	22.8	21.1	19.1	16.1
pZUF6FYE1 #3	19.8	20.7	22.8	17.0	15.8
pZUF6FYE1 #4	16.8	22.4	23.7	16.1	16.8
pZUF6FYE1 #5	17.7	21.6	21.2	18.0	17.2
平均	**17.7**	**21.9**	**21.9**	**17.9**	**16.5**

【０７２２】
ＧＣ分析は、ｐＺＵＦ６ＳによるＹ２０３１形質転換体中で全脂質の約３１．１％のＣ１６（Ｃ１６：０＋Ｃ１６：１）が生成した一方、ｐＺＵＦ６ＦＹＥ１によるＹ２０３１形質転換体中では約３９．６％のＣ１６が生成したことを測定した。ｐＺＵＦ６Ｓによる形質転換体と比べて、ｐＺＵＦ６ＦＹＥ１形質転換体中ではＣ１６の総量が約２６．７％増大した。したがってこれらのデータはヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）中でＹＥ１がＣ$_{14/16}$脂肪酸エロンガーゼとして機能し、Ｃ１６脂肪酸を生成することを実証した。さらにｐＺＵＦ６ＦＹＥ１形質転換体中ではｐＺＵＦ６Ｓ形質転換体中よりも５７％より多くのＧＬＡが生成し、ＹＥ１エロンガーゼが、炭素流動を遺伝子操作された経路に進めて、より多くの最終生成物（すなわちＧＬＡ）を生成することを提案した。
【０７２３】
実施例２４
パーセントＰＵＦＡを増大させるヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）のＣＰＴ１過剰発現
本実施例は、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＣＰＴ１　ｃＤＮＡ（配列番号１５０）を過剰発現するように形質転換された、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）Ｙ２０６７Ｕ株（実施例１３）における増大するＥＰＡ生合成および蓄積について述べる。ＥＰＡ合成をもたらすＰＵＦＡもまた増大した。Δ６デサチュラーゼ／Δ６エロンガーゼ経路またはΔ９エロンガーゼ／Δ８デサチュラーゼ経路のどちらかを通じてＤＨＡを生成するように遺伝子操作されたＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）宿主株は、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＣＰＴ１が、（例えばＹ３０００株中で）同様に同時発現されれば、増大するＤＨＡ生合成および蓄積を実証できることが考察される。
【０７２４】
Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）株ＡＴＣＣ＃２０３２６　ｃＤＮＡを以下

の手順を使用して調製した。細胞を２００ｍＬのＹＰＤ培地（２％バクトイースト抽出物、３％バクトペプトン、２％グルコース）中で１日間３０℃で生育させ、次にベックマン（Ｂｅｃｋｍａｎ）ＧＨ３．８ローター内で３７５０ｒｐｍで１０分間の遠心分離によってペレット化し、ＨＧＭで２回洗浄した。洗浄した細胞を２００ｍＬのＨＧＭに再懸濁し、さらに４時間３０℃で生育させた。次に細胞を３７５０ｒｐｍで１０分間の遠心分離によって４×５０ｍＬ試験管内に採取した。

【０７２５】

キアゲン（Ｑｉａｇｅｎ）ＲＮｅａｓｙ全ＲＮＡミディ（Ｍｉｄｉ）キットを使用して全ＲＮＡを単離した。細胞を破壊するために、採取した細胞を４×６００μＬのキット緩衝液ＲＬＴ（製造業者の指定通りにβ－メルカプトエタノールで栄養強化した）に再懸濁し、４本の２ｍＬネジ口試験管内で、等容積の０．５ｍｍガラスビーズと混合した。バイオスペック（Ｂｉｏｓｐｅｃ）ミニビーズビーターを使用して、均質化設定で細胞を２分間破壊した。追加的な４×６００μＬの緩衝液ＲＬＴを添加した。ガラスビーズおよび細胞残骸を遠心分離によって除去し、製造業者のプロトコルに従って、上清を使用して全ＲＮＡを単離した。

【０７２６】

キアゲンオリゴテックス（Ｑｉａｇｅｎ　Ｏｌｉｇｏｔｅｘ）ｍＲＮＡ精製キットを使用して、製造業者のプロトコルに従って、上の全ＲＮＡサンプルからポリＡ（＋）ＲＮＡを単離した。ｍＲＮＡサンプルの純度を確証するために、単離されたポリＡ（＋）ＲＮＡを同一キットでさらにもう１回精製した。最終精製ポリ（Ａ）＋ＲＮＡは３０．４ｎｇ／μＬの濃度を有した。

【０７２７】

第１のｃＤＮＡ鎖合成のために使用されるＰＣＲサーモサイクラー条件が、９５℃で２０秒間と、それに続く９５℃で５秒間および６８℃で６分間を２０サイクルに設定されたこと以外は、実施例１６で述べられるようにして、ＢＤクローンテック（ＢＤ－Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）が指定するＬＤ－ＰＣＲ法、および０．１μｇのポリＡ（＋）ＲＮＡサンプルを使用してｃＤＮＡを生じさせた。ＰＣＲ生成物は、アガロースゲル電気泳動法および臭化エチジウム染色によって定量化した。

【０７２８】

Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＣＰＴ１　ｃＤＮＡを次のようにしてクローンした。プライマーＣＰＴ１－５’－ＮｃｏＩおよびＣＰＴ１－３’－ＮｏｔＩ（配列番号４３８および４３９）を使用して、ＰＣＲによって、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）のｃＤＮＡからＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＯＲＦを増幅した。反応混合物は、０．５μＬのｃＤＮＡ、各０．５μＬのプライマー、１１μＬの水、および日本国滋賀県大津市５２０－２１９３のタカラバイオからの１２．５μＬのＥｘＴａｑプレミクス２×Ｔａｑ　ＰＣＲ溶液を含有した。増幅を次のように実施した。９４℃で３００秒間の初期変性と、それに続く９４℃で３０秒間の変性、５５℃で３０秒間のアニーリング、および７２℃で６０秒間の延長を３０サイクル。最終延長サイクルを７２℃で１０分間実施し、４℃での反応終結がそれに続いた。約１１９０ｂｐのＤＮＡ断片がＰＣＲ反応から得られた。それをキアゲン（キアゲン（Ｑｉａｇｅｎ））のＰＣＲ精製キットを使用して、製造業者のプロトコルに従って精製した。精製されたＰＣＲ生成物をＮｃｏＩおよびＮｏｔＩ消化し、遺伝子がＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＦＢＡＩＮプロモーターおよびＰＥＸ２０－３’ターミネーター領域の制御下にあるように、Ｎｃｏ　Ｉ－Ｎｏｔ　Ｉ切断ｐＺＵＦ１７ベクター（配列番号１６２；図９Ｂ）中にクローンした。正確な形質転換体をミニプレップ分析によって確認し、得られたプラスミドを「ｐＹＣＰＴ１－１７」（配列番号２０４）と命名した。

【０７２９】

キメラＦＢＡＩＮ：：ＣＰＴ１：：ＰＥＸ２０遺伝子をヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）のゲノム中に組み込むために、ｐＹＣＰＴ１－１７をＮｃｏＩおよびＮｏｔＩで消化してプラスミドｐＹＣＰＴ１－ＺＰ２ｌ７を作り出

し、ＣＰＴ１　ＯＲＦを含有する約１１９０ｂｐの断片を単離した。次にこの断片をＮｃｏＩおよびＮｏｔＩで消化したｐＺＰ２ｌ７＋Ｕｒａ（配列番号２０５）中にクローンした。図２２Ｃに示すように、プラスミドｐＺＰ２ｌ７＋Ｕｒａは、キメラＴＥＦ：：合成Δ１７デサチュラーゼ（Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）のためにコドン最適化された）：：Ｐｅｘ２０－３’遺伝子、および選択マーカーとして使用するためのＵｒａ３遺伝子を含んでなる、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）組み込みプラスミドである。正確な形質転換体をミニプレップ分析によって確認し、得られたプラスミドを「ｐＹＣＰＴ１－ＺＰ２ｌ７」（配列番号２０６）と命名した。

【０７３０】

一般方法に従って、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）Ｙ２０６７Ｕ株（実施例１３から）をＢｓｓＨＩＩ／ＢｂｕＩ消化ｐＹＣＰＴ１－ＺＰ２ｌ７およびｐＺＵＦ－ＭＯＤ－１（前出、実施例１７）によってそれぞれ形質転換した。形質転換体をアミノ酸で栄養強化された合成ＭＭ中で２日間、続いてＨＧＭ中で４日間生育させた。（一般方法で述べられるような）ＧＣ分析に基づいた、ｐＺＵＦ－ＭＯＤ－１を含有する２つの形質転換体、およびゲノム中にｐＹＣＰＴ１－ＺＰ２ｌ７が組み込まれた４つの形質転換体の脂肪酸プロフィールを下の表に示す。脂肪酸は１８：０、１８：１（オレイン酸）、１８：２（ＬＡ）、ＧＬＡ、ＤＧＬＡ、ＡＲＡ、ＥＴＡ、およびＥＰＡとして同定され、それぞれの組成は全脂肪酸の％として表される。

【０７３１】

【表６６】

表56

*Y.リポリティカ*CPT1を過剰発現するように遺伝子操作された

*ヤロウィア*Y2067U株の脂質組成

株	全脂肪酸							
	18:0	18:1	18:2	GLA	DGLA	ARA	ETA	EPA
Y2067U+pZUF-MOD-1 #1	1.3	6.9	12.0	23.1	5.7	1.1	3.8	13.2
Y2067U+pZUF-MOD-1 #2	1.4	6.8	12.1	22.0	5.8	1.1	3.8	13.5
Y2067U+pYCPT1-ZP2l7 #1	0.6	8.0	8.2	27.4	7.1	1.6	4.1	15.7
Y2067U+pYCPT1-ZP2l7 #2	0.6	8.1	8.2	27.2	7.0	1.6	4.0	15.7
Y2067U+pYCPT1-ZP2l7 #3	1.0	7.9	8.0	24.7	6.1	1.6	3.2	15.5
Y2067U+pYCPT1-ZP2l7 #4	0.6	7.1	8.6	25.5	6.9	1.8	4.0	16.0

【０７３２】

上に示されるように、ゲノム組み込みによる、強力なＦＢＡＩＮプロモーター制御下にあるＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＣＰＴ１の発現は、％ＥＰＡを「対照」株中の１３．４％から１５．７～１６％に増大させた。さらにＧＬＡ、ＤＧＬＡ、およびＡＲＡレベルもまた増大した。

【０７３３】

実施例２５

パーセントＰＵＦＡを増大させるサッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）ＩＳＣ１

本実施例は、Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）ＩＳＣ１遺伝子（配列番号１５２）を同時発現するように形質転換された、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）Ｍ４株（実施例６）における増大するＥＰＡ生合成および蓄積について述べる。Δ６デサチュラーゼ／Δ６エロンガーゼ経路またはΔ９エロンガーゼ／Δ８デサチュラーゼ経路のどちらかを通じてＤＨＡを生成するように遺伝子操作されたＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）宿主株は、Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖ

ｉｓｉａｅ）ＩＳＣ１が（例えばＹ３０００株中で）同様に同時発現されれば、増大するＤＨＡ生合成および蓄積を実証できることが考察される。

【０７３４】

Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）ＩＳＣ１　ＯＲＦを次のようにしてプラスミドｐＺＰ２ｌ７＋Ｕｒａ中にクローンした。最初にウィスコンシン州マディソンのプロメガ（Ｐｒｏｍｅｇａ（Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ））からのＳ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）株Ｓ２８８Ｃからのゲノムｄｎａ、およびプライマーペアＩｓｃ１ＦおよびＩｓｃ１Ｒ（配列番号４４０および４４１）を使用して、ＯＲＦをＰＣＲ増幅した。ＮｃｏＩ部位を組み込み、それによってＩＳＣ１をフレーム内に留めることが必要であったために、プライマーＩｓｃ１Ｆは、増幅されたＯＲＦ中でＩＳＣ１の野生型５’配列を「ＡＴＧＴＡＣＡＡ」から「ＡＴＧＧＡＣＡＡ」に変性した。増幅を次のように実施した。９４℃で１２０秒間の初期変性と、それに続く９４℃で３０秒間の変性、５０℃で３０秒間のアニーリング、および６８℃で１２０秒間の延長を３５サイクル。最終延長サイクルを６８℃で１０分間実施し、４℃での反応終結がそれに続いた。１４５５ｂｐのＤＮＡ断片がＩＳＣ１のＰＣＲ反応から得られ、カリフォルニア州カールズバッドのインビトロジェン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ））からの１％アガロースゲル（１２０Ｖで３０分間）および１ｋＢのＤＮＡ標準ラダーを使用した電気泳動法によって、ＰＣＲ生成物サイズを確認した。

【０７３５】

カリフォルニア州オレンジのザイモ・リサーチ社（Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ（Ｏｒａｎｇｅ，ＣＡ））からのＤＮＡクリーン＆コンセントレーター－５（Ｃｌｅａｎ　＆　Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｏｒ－５）キットを使用して、製造業者の使用説明書に従ってＤＮＡを精製し、次にＮｃｏＩ／ＮｏｔＩで消化した。次にＩＳＣ１断片を個別にｐＺＰ２ｌ７＋Ｕｒａ（配列番号２０５、図２２Ｃ）中にクローンし、ＮｃｏＩおよびＮｏｔＩで消化した。正確な形質転換体をゲル電気泳動法によって確認し、得られたプラスミドを「ｐＴＥＦ：：ＩＳＣ１」（配列番号２０７）と命名した。したがってこのプラスミドは、３’－ＰＯＸ２、ＵＲＡ３、ＴＥＦ：：ＩＳＣ１：：Ｐｅｘ２０、およびＰＯＸ２プロモーター領域を含んでなるＤＮＡカセットを含有した。

【０７３６】

「対照」ベクターを次のようにして調製した。最初にＳ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）Ｓ２８８Ｃ株からのゲノムＤＮＡ、およびプライマーペアＰｃｌ１ＦおよびＰｃｌ１Ｒ（配列番号４４２および４４３）を使用して、Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）ｐｃｌ１　ＯＲＦ（有糸分裂細胞サイクルへの侵入および形態形成制御に関与するタンパク質をコードする）をＰＣＲ増幅した。上述のように増幅を実施した。ｐｃｌ１のＰＣＲ反応から８６１ｂｐのＤＮＡ断片が得られた（電気泳動法によって確認された、前出）。ＤＮＡクリーン＆コンセントレーター－５（Ｃｌｅａｎ　＆　Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｏｒ－５）キットを使用してＤＮＡを精製し、次にＮｃｏＩ／ＮｏｔＩで消化した。次に断片を同様に消化されたｐＺＰ２ｌ７＋Ｕｒａ中にクローンした。正確な形質転換体をゲル電気泳動法によって確認し、得られたプラスミドを「ｐＴＥＦ：：ｐｃｌ１」と命名した。次にプラスミドｐＴＥＦ：：ｐｌｃ１をＨｉｎｃＩＩで消化して、ｐｃｌ１　ＯＲＦを除去した。残りのプラスミドをＡｓｃＩ／ＳｐｈＩでの消化に際して、３’－ＰＯＸ２、ＵＲＡ３、ＴＥＦ：：Ｐｅｘ２０およびＰＯＸ２プロモーター領域を含んでなる直鎖ＤＮＡカセットがもたらされるように、再度ライゲートした。

【０７３７】

コンピテントＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）Ｍ４株細胞（実施例６から）をＡｓｃ１／Ｓｐｈ１消化ｐＴＥＦ：：ＩＳＣ１および「対照」でそれぞれ形質転換した（各５μｇのプラスミドが消化された）。ザイモ・リサーチ（Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）からのフローズン（Ｆｒｏｚｅｎ）ＥＺ酵母形質転換ＩＩキットを使用して形質転換を達成し、アミノ酸なしのＹＮＢ（６．７ｇ／Ｌ、メリーランド州スパークスのベクトン・ディキンソン社（Ｂｅｃｔｏｎ，Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　＆　Ｃｏ．（Ｓｐａｒｋｓ，Ｍ

Ｄ））［カタログ番号２９１９４０］）、グルコース（２０ｇ／Ｌ）、および寒天（２０ｇ／Ｌ）を含んでなるプレート上で形質転換体を選択した。数百個の形質転換体コロニーが得られた。５個の独立したＩＳＣ１の形質転換体からのゲノムＤＮＡを使用して、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＰＯＸ２遺伝子座中への各ＤＮＡカセットの組み込みをＰＣＲによって確認した。

【０７３８】

形質転換体を２％グルコースを含有するアミノ酸非含有ＹＮＢ中で２日間生育させた。細胞を遠心分離によって採取し、１００ｇ／Ｌデキストロース、２ｇ／ＬのＭｇＳＯ$_4$、およびｐＨ６．５の５０ｍＭリン酸緩衝液を含んでなる培地に再懸濁して、さらに５日間生育させた。０．７５ｍＬの各培養からの細胞を遠心分離によって採取して、それらの脂肪酸組成を分析した。（一般方法で述べられるような）ＧＣ分析に基づいた、「対照」ベクターを含んでなる３つの形質転換体およびｐＴＥＦ：：ＩＳＣ１を含んでなる５つの形質転換体の脂肪酸プロフィールを下に示す。脂肪酸は、１６：０、１６：１、１８：０、１８：１（オレイン酸）、１８：２（ＬＡ）、ＧＬＡ、ＤＧＬＡ、ＡＲＡ、ＥＴＡ、およびＥＰＡとして同定され、それぞれの組成は全脂肪酸の％として表される。

【０７３９】

【表６７】

表57

S.セレヴィシエISC1を過剰発現するように遺伝子操作された*ヤロウィア*M4株の脂質組成

株	全脂肪酸									
	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	GLA	DGLA	ARA	ETA	EPA
M4+「対照」	14.7	7.2	2.1	13.5	8.7	21.8	8.9	0.9	4.1	9.3
M4+pTEF::ISC1	13.5	8.5	1.7	15.6	8.1	21.3	7.5	0.7	3.9	10.7

【０７４０】

Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）ＩＳＣ１遺伝子の発現は、パーセントＥＰＡを「対照」株中の９．３％から１０．７％（「Ｍ４＋ｐＴＥＦ：：ＩＳＣ１」）に改善し、１４．５％の増大を示した。

【０７４１】

実施例２６

ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）アシルトランスフェラーゼノックアウトの創出

本実施例は、ＰＤＡＴ、ＤＧＡＴ２、ＤＧＡＴ１、ＰＤＡＴおよびＤＧＡＴ２、ＰＤＡＴおよびＤＧＡＴ１、ＤＧＡＴ１およびＤＧＡＴ２、またはＰＤＡＴ、ＤＧＡＴ１およびＤＧＡＴ２遺伝子のいずれかで中断された、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）の単一、二重、および三重ノックアウト株の創生について述べる。各ノックアウト株の遺伝子の中断が確認され、実施例２７の全脂質のＧＣ分析によって、脂肪酸含量および組成に対する各中断の分析が判定された。

【０７４２】

ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＤＧＡＴ２遺伝子の標的を定めた中断

プラスミドｐＹ２１ＤＧＡＴ２と称される標的カセットによる内在性ＤＧＡＴ２遺伝子の相同的遺伝子組換え媒介置換によって、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ））ＡＴＣＣ＃９０８１２中のＤＧＡＴ２遺伝子の標的を定めた中断を実施した。ｐＹ２１ＤＧＡＴ２は、プラスミドｐＹ２０から誘導された（図２２Ｄ、配列番号２０８）。具体的にはｐＹ２１ＤＧＡＴ２は、５７０ｂｐのＨｉｎｄ　ＩＩＩ／Ｅｃｏ　ＲＩ断片を同様に直線化されたｐＹ２０中に挿入して作り出された。この５７０ｂｐのＤＮＡ断片は（５’

から３’に向けて）次を含有した。（配列番号１３０中のコード配列（ＯＲＦ）の）位置＋１０９０～＋１４６４の３’相同配列、（配列番号１３０中のコード配列（ＯＲＦ）の）位置＋９０６から＋１０８９のＢｇｌＩＩ制限部位および５’相同配列。２組のＰＣＲプライマーＰ９５およびＰ９６（配列番号４４４および４４５）、そしてＰ９７およびＰ９８（配列番号４４６および４４７）をそれぞれ使用して、ＰＣＲ増幅によって断片を調製した。

【０７４３】

ｐＹ２１ＤＧＡＴ２をＢｇｌ　ＩＩ制限酵素消化によって直線化し、一般方法に従って対数増殖中期のＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＴＣＣ＃９０８１２細胞中に形質転換した。ＹＰＤハイグロマイシン選択プレート上に細胞を播種して、３０℃に２～３日間保った。

【０７４４】

１４個のＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＴＣＣ＃９０８１２ハイグロマイシン抵抗性コロニーが単離され、ＰＣＲによって標的を定めた中断についてスクリーニングした。１対のＰＣＲプライマー（Ｐ１１５およびＰ１１６［配列番号４４８および４４］）をデザインし、相同的組換えに続いて特定の接合部断片を増幅した。別の１対のＰＣＲプライマー（Ｐ１１５およびＰ１１２［配列番号４５０］）をデザインして、天然遺伝子を検出した。

【０７４５】

ＡＴＣＣ＃９０８１２株の１４個のハイグロマイシン抵抗性コロニー中の２個が、接合部断片について陽性であり、天然断片について陰性であった。したがってこれらの２菌株において標的を定めた組み込みが確認され、その１つを「Ｓ－Ｄ２」と命名した。

【０７４６】

ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＰＤＡＴ遺伝子の標的を定めた中断

ｐＬＶ１３（図２２Ｅ、配列番号２０９）と称される標的カセットによる、内在性ＰＤＡＴ遺伝子の相同的組換え媒介置換によって、Ｙ．リポリティカ（Ｙ．ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＴＣＣ＃９０８１２におけるＰＤＡＴ遺伝子の標的を定めた中断を実施した。ｐＬＶ１３はプラスミドｐＹ２０（図２２Ｄ、配列番号２０８）から誘導された。具体的にはｐＹ２０のハイグロマイシン抵抗性遺伝子をヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）Ｕｒａ３遺伝子で置き換えて、プラスミドｐＬＶ５を作り出した。次に，９９２ｂｐのＢａｍ　ＨＩ／Ｅｃｏ　ＲＩ断片を同様に直線化されたｐＬＶ５に挿入して、ｐＬＶ１３を作り出した。９９２ｂｐのＤＮＡ断片は、（５’から３’に向けて）次を含有した。（配列番号１１７中のコード配列（ＯＲＦ）の）位置＋８７７～＋１３７１の３’相同配列、ＢｇｌＩＩ制限部位、および（配列番号１１７中のコーディング配列（ＯＲＦ）の）位置＋３９０～＋８７６の５’相同配列。ＰＣＲプライマーＰ３９およびＰ４１（配列番号４５１および４５２）、そしてＰ４０およびＰ４２（配列番号４５３および４５４）をそれぞれ使用して、ＰＣＲ増幅によって断片を調製した。

【０７４７】

ｐＬＶ１３をＢｇｌ　ＩＩ制限消化によって直線化し、一般方法に従って対数増殖中期のＹ．リポリティカ（Ｙ．ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＴＣＣ＃９０８１２細胞中に形質転換した。細胞をＢｉｏ１０１　ＤＯＢ／ＣＳＭ－Ｕｒａ選択プレート上に播いて、２～３日間３０℃に保った。

【０７４８】

１０個のＹ．リポリティカ（Ｙ．ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＴＣＣ＃９０８１２コロニーが単離され、ＰＣＲによって標的を定めた中断についてスクリーニングした。１対のＰＣＲプライマー（Ｐ５１およびＰ５２［配列番号４５５および４５６］）をデザインし、標的カセットを増幅した。別の１対のＰＣＲプライマー（Ｐ３７およびＰ３８［配列番号４５７および４５８］）をデザインし、天然遺伝子を検出した。１０菌株中の１０菌株が接合部断片について陽性であり、１０菌株中の３菌株が天然断片について陰性であったの

で、これらの３菌株における標的を定めた組み込みの成功が確認された。これらの菌株の１つを「Ｓ－Ｐ」と命名した。

【０７４９】

ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＤＧＡＴ１遺伝子の標的を定めた中断

縮重ＰＣＲプライマーＰ２０１およびＰ２０３（それぞれ配列番号４５９および４６０）、およびテンプレートとしてＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＴＣＣ＃７６９８２ゲノムＤＮＡを使用して、ＰＣＲによって全長Ｙｌ　ＤＧＡＴ１　ＯＲＦをクローンした。Ｙｌ　ＤＧＡＴ１をコードするヌクレオチド配列が分かっていなかったので、縮重プライマーが必要であった。

【０７５０】

ロボサイクラー・グラディエント（ＲｏｂｏＣｙｃｌｅｒ　Ｇｒａｄｉｅｎｔ）４０ＰＣＲマシン内でＰＣＲを実施し、増幅を次のように実施した。９５℃で１分間の初期変性と、それに続く９５℃で３０秒間の変性、５５℃で１分間のアニーリング、および７２℃で１分間の延長を３０サイクル。最終延長サイクルを７２℃で１０分間実施し、４℃での反応終結がそれに続いた。アガロースゲル電気泳動法によって予期されたＰＣＲ生成物（約１．６ｋＢ）を検出し、単離して精製し、インビトロジェン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）からのＴＯＰＯ（登録商標）クローニングベクター中にクローンして、部分的に配列決定してその同一性を確認した。

【０７５１】

（上でＤＧＡＴ２について述べられる方法を使用して）内在性ＤＧＡＴ１遺伝子の標的カセットとの相同的組換え媒介置換によって、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＴＣＣ＃９０８１２中の推定上のＤＧＡＴ１遺伝子の標的を定めた中断を実施した。具体的には１．６ｋＢの単離されたＹｌ　ＤＧＡＴ１　ＯＲＦ（配列番号１２２）をＰＣＲテンプレート分子として使用し、５’相同的Ｙｌ　ＤＧＡＴ１配列（プライマーＰ２１４およびＰ２１５（配列番号４６１および４６２）によって増幅された）、ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）ロイシン２（Ｌｅｕ２、ジェンバンク登録番号ＡＡＡ３５２４４）遺伝子、および３’相同的Ｙｌ　ＤＧＡＴ１配列（プライマーＰ２１６およびＰ２１７（配列番号４６３および４６４）で増幅された）からなるＹｌ　ＤＧＡＴ１標的カセットを構築した。ストラタジーン（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）からのＰｆｕウルトラポリメラーゼ（カタログ番号６００６３０）および上述のサーモサイクラー条件による標的カセットの個々の各部分の増幅に続いて、各断片を精製した。ＰＣＲプライマーＰ２１４およびＰ２１９（配列番号４６５）を使用した２回目のＰＣＲ反応のためのテンプレート分子として、３個の正確なサイズの精製断片を共に混合して、Ｙｌ　ＤＧＡＴ１中断カセットを得た。

【０７５２】

標的カセットをゲル精製して使用し、対数増殖中期の野生型Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）（ＡＴＣＣ＃９０８１２）を形質転換した。一般方法で述べられるようにして形質転換を実施した。形質転換体をＢｉｏ１０１　ＤＯＢ／ＣＳＭ－Ｌｅｕ選択プレート上に播種して、３０℃に２～３日間保った。いくつかのロイシン原栄養株をＰＣＲによってスクリーンし、標的を定めたＤＧＡＴ１中断を確認した。具体的には１対のＰＣＲプライマー（Ｐ２２６およびＰ２２７［配列番号４６６および４６７］）をデザインして、中断カセットと天然標的遺伝子間の接合部を増幅した。別の１対のＰＣＲプライマー（Ｐ２１４およびＰ２１７［それぞれ配列番号４６１および４６４］）をデザインして、天然遺伝子を検出した。

【０７５３】

全てのロイシン原栄養株コロニーは、接合部断片について陽性であり、天然断片について陰性であった。したがってこれらの株において、標的を定めた組み込みが確認され、その１つを「Ｓ－Ｄ１」と命名した。

【０７５４】

ＰＤＡＴおよび／またはＤＧＡＴ２および／またはＤＧＡＴ１遺伝子の中断を含有するヤ

ロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）二重および三重ノックアウト株の創生

単一ＰＤＡＴ中断について述べられたようにして、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＴＣＣ＃９０８１２ハイグロマイシン抵抗性「Ｓ－Ｄ２」突然変異体（ＤＧＡＴ２中断を含有する）をプラスミドｐＬＶ１３（ＰＤＡＴ中断を含有する）で形質転換し、ＰＣＲによって形質転換体をスクリーニングした。１２個の形質転換体の内２つは、ＤＧＡＴ２およびＰＤＡＴ遺伝子の双方が中断されていることが確認された。これらの株の１つを「Ｓ－Ｄ２－Ｐ」と命名した。

【０７５５】

同様にして、ＤＧＡＴ１およびＰＤＡＴ（「Ｓ－Ｄ１－Ｐ」）、ＤＧＡＴ２およびＤＧＡＴ１（「Ｓ－Ｄ２－Ｄ１」）に二重ノックアウトがある株、ＤＧＡＴ２、ＤＧＡＴ１、およびＰＤＡＴ（「Ｓ－Ｄ２－Ｄ１－Ｐ」）に三重ノックアウトがある株を作った。

【０７５６】

実施例２７

脂質含量を減少させパーセントＰＵＦＡを増大させるヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）アシルトランスフェラーゼノックアウト

本実施例は、脂肪酸含量および組成の変化によって測定される、野生型ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）およびＥＰＡを生成するようにあらかじめ遺伝子操作されたＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）株における、単一および／または二重および／または三重アシルトランスフェラーゼノックアウトの効果を分析する。Δ６デサチュラーゼ／Δ６エロンガーゼ経路またはΔ９エロンガーゼ／Δ８デサチュラーゼ経路のどちらかを通じてＤＨＡを生成するように遺伝子操作されたＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）宿主株は、宿主の天然アシルトランスフェラーゼに対する同様の操作が行われれば（例えばＹ３０００株内で）、増大するＤＨＡ生合成および蓄積を実証できることが考察される。

【０７５７】

アシルトランスフェラーゼ中断があるＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＴＣＣ＃９０８１２におけるＴＡＧ含量減少

最初に、野生型および次を含有する突然変異Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＴＣＣ＃９０８１２中のＴＡＧ含量を比較した。（１）ＰＤＡＴ、ＤＧＡＴ２、およびＤＧＡＴ１中の単一中断、（２）ＰＤＡＴおよびＤＧＡＴ２、ＤＧＡＴ１およびＰＤＡＴ、およびＤＧＡＴ１およびＤＧＡＴ２中の二重中断、および（３）ＰＤＡＴ、ＤＧＡＴ２、およびＤＧＡＴ１中の三重中断。

【０７５８】

具体的には、野生型および突然変異Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＴＣＣ＃９０８１２（すなわちＳ－Ｄ１、Ｓ－Ｄ２、Ｓ－Ｐ、Ｓ－Ｄ１－Ｄ２、Ｓ－Ｄ１－Ｐ、Ｓ－Ｄ２－Ｐ、およびＳ－Ｄ１－Ｄ２－Ｐ株）を含有するプレートからのループ１つ分の細胞を３ｍＬのＹＰＤ培地中にそれぞれ別々に接種して、振盪機（３００ｒｐｍ）上で一晩３０℃で生育させた。細胞を採取して０．９％ＮａＣｌで１回洗浄し、５０ｍＬのＨＧＭに再懸濁した。次に振盪機上で細胞を４８時間生育させた。細胞を水で洗浄し、細胞ペレットを凍結乾燥した。ＴＬＣ（下記）およびＧＣ分析に続く、ＧＣ分析による全脂肪酸および油分画のために、２０ｍｇの乾燥細胞重量を使用した。

【０７５９】

ＴＬＣのために使用される方法は、以下の５段階で述べられる。１）内部標準１５：０脂肪酸（１０μＬの１０ｍｇ／ｍＬ）を２～３ｍｇの乾燥細胞塊に添加し、メタノール／クロロホルム法を使用した総脂質の抽出がそれに続いた。２）２５～５０μＬの微量ピペットを使用して、５×２０ｃｍシリカゲル６０プレートの下端からおよそ１インチのところに鉛筆で薄く描いた線を横切って、抽出した脂質（５０μＬ）をブロットした。３）次にＴＬＣプレートをN_2下で乾燥させ、約１００ｍＬの８０：２０：１のヘキサン：エチルエーテル：酢酸溶剤を含有するタンクに挿入した。４）バンドの分離後、プレートの片

面にヨウ素蒸気を吹き付けてバンドを同定した。これによってさらなる分析のために、カミソリの刃を使用してプレートのもう一方の面のサンプルがこすり取れるようになった。５）こすり取ったサンプルの塩基性エステル交換反応、およびＧＣ分析を一般方法で述べられるようにして実施した。

【０７６０】

ＧＣ結果を下の表５８に示す。培養は次のように記述される。「Ｓ」株（野生型）、「Ｓ－Ｐ」（ＰＤＡＴノックアウト）、「Ｓ－Ｄ１」（ＤＧＡＴ１ノックアウト）、「Ｓ－Ｄ２」（ＤＧＡＴ２ノックアウト）、「Ｓ－Ｄ１－Ｄ２」（ＤＧＡＴ１およびＤＧＡＴ２ノックアウト）、「Ｓ－Ｐ－Ｄ１」（ＰＤＡＴおよびＤＧＡＴ１ノックアウト）、「Ｓ－Ｐ－Ｄ２」（ＰＤＡＴおよびＤＧＡＴ２ノックアウト）、および「Ｓ－Ｐ－Ｄ１－Ｄ２」（ＰＤＡＴ、ＤＧＡＴ１およびＤＧＡＴ２ノックアウト）。使用した略語は次の通り。「ＷＴ」＝野生型、「ＦＡ」＝脂肪酸、「ｄｃｗ」＝乾燥細胞重量、および「ＦＡ％ｄｃｗ、％ＷＴ」＝野生型中の％に対するＦＡ％、「Ｓ」株は野生型である。

【０７６１】

【表６８】

表58

PDAT、DGAT2、およびDGAT1に単一、二重、または三重中断がある

*ヤロウィア*ATCC#90812株の脂質含量

			全脂肪酸			TAG画分		
株	残留 DAG AT	dcw, mg	FAs, μg	FA%dcw	FA%dcw, %WT	FAs, μg	FA% dcw	FA%dcw, %WT
S	D1、D2、P	32.0	797	15.9	100	697	13.9	100
S-D1	D2、P	78.8	723	13.6	86	617	11.6	83
S-D2	D1、P	37.5	329	6.4	40	227	4.4	32
S-P	D1、D2	28.8	318	6.0	38	212	4.0	29
S-D1-D2	P	64.6	219	4.1	26	113	2.1	15
S-D1-P	D2	76.2	778	13.4	84	662	11.4	82
S-D2-P	D1	31.2	228	4.3	27	122	2.3	17
S-D1-D2-P	なし	52.2	139	2.4	15	25	0.4	3

【０７６２】

表５８の結果は、３つのＤＡＧ　ＡＴの油生合成に対する相対的貢献度を示唆する。ＤＧＡＴ２の貢献度が最も高いのに対し、ＰＤＡＴおよびＤＧＡＴ１は貢献度は等しいがＤＧＡＴ２よりも少ない。三重ノックアウト株中の約３％の残留含油量は、ＡＲＥ２（配列番号１１９および１２０）によってコードされるヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）のアシル－ＣｏＡ：ステロール－アシルトランスフェラーゼ酵素の貢献によるものかもしれない。

【０７６３】

ＤＧＡＴ２遺伝子中断があるヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＥＵ株におけるＴＡＧ含量減少およびパーセントＥＰＡ増大

野生型Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＴＣＣ＃９０８１２（前出）における様々なアシルトランスフェラーゼノックアウトの効果を調べた後、次にＥＵ株のＤＧＡＴ２ノックアウト株（すなわち１０％のＥＰＡを生成するように遺伝子操作された、実施例１３）においてＴＡＧ含量および脂肪酸組成物を調べた。

【０７６４】

具体的には、実施例２６でＳ株（ＡＴＣＣ＃９０８１２）について述べられたように、ＥＵ株中のＤＧＡＴ２遺伝子を中断した。ＤＧＡＴ２中断株をＥＵ－Ｄ２と命名した。２つの異なる条件に従った生育に続いて、ＥＵおよびＥＵ－Ｄ２株を採取し分析した。下の

表で「３ｍＬ」と称される条件では、細胞を３ｍＬのＭＭ培地中で１日間生育させ、洗浄して、次に３ｍＬのＨＧＭ中で３日間生育させた。代案としては、下の表で「５１ｍＬ」と称される条件では、細胞を５１ｍＬのＭＭ培地中で１日間生育させ、洗浄して、次に５１ｍＬのＨＧＭ中で３日間生育させた。ＴＬＣ分離（「分画」）に続いて、５１ｍＬ培養の抽出物中でホスファチジルコリン（ＰＣ）、ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥ）、およびトリアシルグリセロール（ＴＡＧまたは油）の脂肪酸組成を判定した。

【０７６５】

ＧＣ結果を下の表５９に示す。培養は「ＥＵ」株（野生型）および「ＥＵ－Ｄ２」株（ＤＧＡＴ２ノックアウト）として記述される。脂肪酸は１６：０、１６：１、１８：０、１８：１（オレイン酸）、１８：２（ＬＡ）、ＧＬＡ、ＤＧＬＡ、ＡＲＡ、ＥＴＡ、およびＥＰＡとして同定され、それぞれの組成は全脂肪酸の％として表される。

【０７６６】

【表６９】

表59

DGAT2に中断があるヤロウィアEU株の脂質含量および組成

株および生育	画分	TFA % dcw	% 16:0	% 16:1	% 18:0	% 18:1	% 18:2	% GLA	% DGLA	% ARA	% ETA	% EPA
EU, 3mL	全部		19	10	2	16	12	19	6	0	3	10
EU-D2, 3mL	全部		17	10	1	6	7	24	5	0	6	19
EU, 51mL	全部	37	18	11	3	19	31	5	1		1	4
	PC	2	12	9	1	8	43	7	3		5	4
	PE	1	24	14	0	14	37	5	0		0	1
	TAG	34	18	12	3	21	29	5	1		1	4
EU-D2, 51mL	全部	18	18	8	1	5	7	25	5		5	20
	PC	1	18	6	1	2	4	26	5		11	22
	PE	1	25	7	0	2	5	14	2		3	8
	TAG	15	16	9	1	6	5	26	6		5	21

【０７６７】

結果は、ＤＧＡＴ２ノックアウトが、％ＥＰＡ（全脂肪酸の）の倍増および脂質含量（％ｄｃｗとして）の半減をもたらすことを示す。さらに脂質含量に観察されたほとんど全ての変化は、ＴＡＧ画分中の変化によるものである。ＥＵ株の５１ｍＬ培養中の期待されたよりも低い％ＥＰＡは、おそらく不安定性によるものであろう。

【０７６８】

アシルトランスフェラーゼ遺伝子中断があるヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＭＵ株におけるＴＡＧ含量低下およびパーセントＥＰＡ増大

最後に、ＥＵ株－Ｄ２中の単一ＤＧＡＴ２ノックアウトからもたらされる％ＥＰＡ増大および脂質含量低下に基づいて、次にＭＵ株（１４％のＥＰＡを生成するように遺伝子操作された、実施例１５参照）の様々なアシルトランスフェラーゼノックアウト株において、ＴＡＧ含量および脂肪酸組成を調べた。具体的にはＭＵ株において、ＰＤＡＴ、ＤＧＡＴ２、およびＤＧＡＴ１中の単一中断、ＰＤＡＴおよびＤＧＡＴ２中の二重中断が作り出された。４つの異なる生育条件での生育に続いて、これらの各株中で脂質含量および組成物を比較した。

【０７６９】

より具体的には（ＤＧＡＴ１中断の選択がＵＲＡ３遺伝子に依存したこと以外は）実施例２６で述べられる方法を使用して、ＭＵ株において、ＰＤＡＴ、ＤＧＡＴ２、ＤＧＡＴ

１中の単一中断を作り出した。これは「ＭＵ－Ｄ１」（ＤＧＡＴ１中断）、「ＭＵ－Ｄ２」（ＤＧＡＴ２中断）、および「ＭＵ－Ｐ」（ＰＤＡＴ中断）として同定された単一ノックアウト株をもたらした。個々のノックアウト株は、ＰＣＲによって確認された。さらにＭＵ－Ｄ２株を同じ方法でＰＤＡＴ遺伝子について中断し、中断をＰＣＲによって確認した。得られた二重ノックアウト株を「ＭＵ－Ｄ２－Ｐ」と命名した。

【０７７０】

下で述べるように、ＭＵ－Ｄ１、ＭＵ－Ｄ２、ＭＵ－Ｐ、およびＭ－Ｄ２－Ｐノックアウト株を分析して、脂質含量および組成物に対する各ノックアウトの効果を判定した。さらに油脂生成を促進する生育条件もまた考察して、全脂質含量に対するそれらの効果を判定した。したがって「実験Ａ」、「実験Ｂ」、「実験Ｃ」、および「実験Ｅ」と同定される全部で４つの異なる実験を行った。具体的には上の各株を含有するプレートからループ３つ分の細胞をＭＭＵ培地［実験ＢおよびＣでは３ｍＬ、実験ＡおよびＥでは５０ｍＬ］中に接種して、２４時間（実験Ａ、Ｂ、およびＣ）または４８時間（実験Ｅ）振盪しながら３０℃で生育させた。細胞を採取してＨＧＭ中で１回洗浄し、ＨＧＭ培地（実験ＡおよびＥでは５０ｍＬ、実験Ｂでは３ｍＬ）またはウラシル添加ＨＧＭ培地（「ＨＧＭＵ」）（実験Ｃでは３ｍＬ）のいずれかに再懸濁し、上記のように４日間培養した。一般方法で述べられたように、１つのアリコート（１ｍＬ）をＧＣによる脂質分析のために使用する一方、第２のアリコートを６００ｎｍで培養ＯＤを測定するために使用した。実験ＡおよびＥの残る培養物を採取して水で１回洗浄し、乾燥細胞重量（ｄｃｗ）測定のために凍結乾燥した。対照的に実験ＢおよびＣのｄｃｗは、それらの関係を示す式を使用してそれらのＯＤ$_{600}$から判定された。実験Ａ、Ｂ、Ｃ、およびＥの異なる各株の脂肪酸組成もまた判定した。

【０７７１】

結果を下の表６０に示す。培養物は、「ＭＵ」株（親ＥＰＡ生成株）、「ＭＵ－Ｐ」（ＰＤＡＴノックアウト）、「ＭＵ－Ｄ１」（ＤＧＡＴ１ノックアウト）、「ＭＵ－Ｄ２」（ＤＧＡＴ２ノックアウト）、および「ＭＵ－Ｄ２－Ｐ」（ＤＧＡＴ２およびＰＤＡＴノックアウト）として表現される。使用した略語は以下のとおり。「ＷＴ」＝野生型（すなわちＭＵ）、「ＯＤ」＝光学濃度、「ｄｃｗ」＝乾燥細胞重量、「ＴＦＡ」＝全脂肪酸、および「ＴＦＡ％ｄｃｗ、重量％」＝野生型（「ＭＵ」）株と比較したＴＦＡ％ｄｃｗ。脂肪酸は１６：０、１６：１、１８：０、１８：１（オレイン酸）、１８：２（ＬＡ）、ＧＬＡ、ＤＧＬＡ、ＡＲＡ、ＥＴＡ、およびＥＰＡとして同定される。各組成は全脂肪酸の％として表される。

【０７７２】

【表７０】

表60
様々なアシルトランスフェラーゼ中断があるヤロウィアMU株の脂質含量および組成

実施例	株	残留DAG AT	第1相生育条件	第2相生育条件	OD	dcw (mg)	TFA (μg)	TFA %dcw	TFA% dcw, %WT	% 16:0	% 16:1	% 18:0	% 18:1	% 18:2	% GLA	% DGLA	% ARA	% ETA	% EPA
A	MU	D1,D2,P	1日間、50mLのMMU	4日間、50mLのHGM	4.0	91	374	20.1	100	17	10	2	18	10	22	7	1	3	9.7
A	MU-D2	D1,P			3.1	75	160	10.4	52	16	12	0	8	9	23	7	0	8	17.4
A	MU-D1	D2,P			4.3	104	217	10.2	51	15	10	2	11	10	22	7	0	7	17.4
A	MU-P	D1,D2			4.4	100	238	11.7	58	16	9	2	11	7	24	7	1	6	17.5
B	MU	D1,D2,P	1日間、3mLのMMU	4日間、3mLのHGM	5.9	118	581	24.1	100	17	9	3	18	10	22	8	1	3	9.1
B	MU-D2	D1,P			4.6	102	248	11.9	50	16	10	0	7	10	24	7	1	7	17.8
B	MU-D1	D2,P			6.1	120	369	15.0	62	18	9	3	14	11	20	7	1	5	12.0
B	MU-P	D1,D2			6.4	124	443	17.5	72	15	8	3	16	10	25	6	1	4	11.9
C	MU	D1,D2,P	1日間、3mLのMMU	4日間、3mLのHGMU	6.8	129	522	19.9	100	16	10	2	13	11	21	10	1	4	12.6
C	MU-D2	D1,P			5.6	115	239	10.2	51	17	9	1	6	11	21	8	1	7	18.9
C	MU-D1	D2,P			6.9	129	395	15.0	75	15	9	2	12	12	20	10	1	5	13.5
C	MU-P	D1,D2			7.1	131	448	16.8	84	17	8	3	14	11	20	10	1	4	11.3
E	MU	D1,D2,P	2日間、50mLのMM	4日間、50mLのHGM	4.6	89	314	17.3	100	16	12	2	18	9	22	7	1	4	11.2
E	MU-D2	D1,P			2.8	62	109	8.5	49	14	12	1	6	8	25	6	0	7	20.0
E	MU-P	D2,P			5.0	99	232	11.5	66	16	10	2	14	7	24	7	1	5	15.8
E	MU-D2-P	D1			4.2	98	98	4.9	28	18	10	0	7	12	20	5	0	6	22.5

【０７７３】

データは形質転換した細胞内の脂質含量が、生育条件次第で変動することを示した。さらに脂質含量に対する各アシルトランスフェラーゼの貢献もまた、変動した。具体的には実験Ｂ、Ｃ、およびＥでは、ＤＧＡＴ２が、ＰＤＡＴまたはＤＧＡＴ１のどちらよりも油生合成により大きく貢献した。対照的に実験Ａで実証されたように、ＤＧＡＴ２、ＤＧＡＴ１、およびＰＤＡＴ中の単一ノックアウトは、脂質含量にほぼ同等の損失をもたらした（すなわちそれぞれ４８％、４９％、および４２％の損失［「ＴＦＡ％ｄｃｗ、重量％」を参照されたい］）。

【０７７４】

脂肪酸組成については、データは、個々の各ＤＡＧ　ＡＴ遺伝子のノックアウトが含油量低下および％ＥＰＡ増大をもたらすことを示す。例えばＤＧＡＴ２ノックアウトは脂質含量のほぼ半減、全脂肪酸中の％ＥＰＡのほぼ倍増をもたらす（ＥＵ株－Ｄ２で観察された結果に類似、前出）。ＤＡＧＡＴ２およびＰＤＡＴの双方のノックアウトは、最少の油と最多の％ＥＰＡをもたらす。

【０７７５】

ここで報告された結果に基づいて、天然ＤＧＡＴ２および／またはＤＧＡＴ１および／またはＰＤＡＴの中断は、ＤＨＡをはじめとする高濃度のＰＵＦＡを生成するように遺伝子操作されたヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）株において（例えばＹ３０００株内で）、％ＰＵＦＡを実質的に増大させる有用な手段であることが考察される。事実、Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）株Ｙ２２１４（Δ９エロンガーゼ／Δ８デサチュラーゼ経路を通じて、１４％のＡＲＡを生成し、野生型Ｙ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＴＣＣ＃２０３６２に対する最終遺伝子型は、Ａｃｏ２－、Ｌｙｓ５－、２Ｘ　ＧＰＡＴ：：ＩｇＤ９ｅ：：ＰＥＸ２０、２Ｘ　ＴＥＦ：：ＩｇＤ９ｅ：：ＬＩＰ１、ＦＢＡＩＮｍ：：ＩｇＤ９ｅ：：ＯＣＴ、２Ｘ　ＦＢＡＩＮ：：Ｄ８ＳＦ：：ＰＥＸ１６、ＧＰＤ：：Ｄ８ＳＦ：：ＰＥＸ１６、ＧＰＡＴ：：ＭＡΔ５：：ＰＥＸ２０、ＦＢＡＩＮ：：ＭＡΔ５：：ＰＥＸ２０、ＹＡＴ１：：Ｉ．Ｄ５Ｓ：：ＬＩＰ１、ＧＰＭ／ＦＢＡＩＮ：：Ｉ．Ｄ５Ｓ：：ＯＣＴ、ＦＢＡＩＮ：：Ｆ．Ｄ１２Ｓ：：ＰＥＸ２０、およびＧＰＭ／ＦＢＡＩＮ：：ｒＥＬＯ２Ｓ：：ＯＣＴ）中の天然ＤＧＡＴ２遺伝子の中断は、パーセントＡＲＡの１．７倍の増大をもたらす（データ示さず）。

【図面の簡単な説明】

【０７７６】

【図１】ω－３／ω－６脂肪酸生合成経路を図示する。

【図２】油性酵母における脂質蓄積のための生化学的機序の概略図である。

【図３Ａ】メガライン（Ｍｅｇａｌｉｇｎ）ＤＮＡＳＴＡＲソフトウェアを使用して作り出された、異なる糸状菌類からのΔ１２デサチュラーゼおよびΔ１５デサチュラーゼタンパク質の系統樹を示す。

【図３Ｂ】ｐＹ５７．Ｙｌ．ＡＨＡＳ．ｗ４９７ｌのプラスミドマップを提供する。

【図４】油性酵母中の脂質蓄積における様々なアシルトランスフェラーゼの役割を示す概略図である。

【図５Ａ】総脂質画分中に（ＤＨＡをはじめとする）様々な脂肪酸を生成する、本発明のいくつかのヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）株の開発を図示する。

【図５Ｂ】総脂質画分中に（ＤＨＡをはじめとする）様々な脂肪酸を生成する、本発明のいくつかのヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）株の開発を図示する。

【図６Ａ】ｐＹ５－３０のプラスミドマップを提供する。

【図６Ｂ】組織化学的染色によって判定された、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＴＣＣ＃７６９８２株中のＴＥＦ、ＧＰＤ、ＧＰＭ、ＦＢＡ、およびＦＢＡＩＮの相対プロモーター活性を図示する。

【図６Ｃ】組織化学的染色によって判定された、様々な培地中で生育させたＹ．リポリテ

ィカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）中のＹＡＴ１、ＴＥＦ、ＧＰＡＴ、およびＦＢＡＩＮの相対プロモーター活性を図示する。
【図７Ａ】蛍光定量的に判定されたヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＴＣＣ＃７６９８２株中のＧＰＤ、ＧＰＭ、ＦＢＡ、およびＦＢＡＩＮのプロモーター活性を比較するグラフである。
【図７Ｂ】ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＡＴＣＣ＃７６９８２株中のＧＵＳ ｍＲＮＡ（すなわちＧＰＤ：：ＧＵＳ、ＧＰＤＩＮ：：ＧＵＳ、ＦＢＡ：：ＧＵＳまたはＦＢＡＩＮ：：ＧＵＳキメラ遺伝子を発現する）をｐＹ５－３０（すなわちキメラＴＥＦ：：ＧＵＳ遺伝子）を発現するＹ．リポリティカ（ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）株のｍＲＮＡレベルと比べて定量化する、リアルタイムＰＣＲ相対計量の結果を図表を用いて要約する。
【図８Ａ】は、ｐＫＵＮＦ１２Ｔ６Ｅのプラスミドマップを提供する。
【図８Ｂ】は、ｐＤＭＷ２７１のプラスミドマップを提供する。
【図８Ｃ】は、ｐＺＰ３Ｌ３７のプラスミドマップを提供する。
【図８Ｄ】は、ｐＺＫＵＴ１６のプラスミドマップを提供する。
【図８Ｅ】は、ｐＫＯ２ＵＭ２５Ｅのプラスミドマップを提供する。
【図９Ａ】は、ｐＤＭＷ３０３のプラスミドマップを提供する。
【図９Ｂ】は、ｐＺＵＦ１７のプラスミドマップを提供する。
【図９Ｃ】は、ｐＺＵＦ４のプラスミドマップを提供する。
【図９Ｄ】は、ｐＦＯＥ２Ｓのプラスミドマップを提供する。
【図９Ｅ】は、ｐＺＰ２ＦＯＥＮ４のプラスミドマップを提供する。
【図１０Ａ】は、ｐＫＵＮＴ２のプラスミドマップを提供する。
【図１０Ｂ】は、ｐＤＭＷ２３７のプラスミドマップを提供する。
【図１０Ｃ】は、ｐＤＭＷ２４０のプラスミドマップを提供する。
【図１０Ｄ】は、酵母発現ベクターｐＹ８９－５のプラスミドマップを提供する。
【図１０Ｅ】は、ｐＫＵＮＦｍＫＦ２のプラスミドマップを提供する。
【図１１】は、ミドリムシ（Ｅｕｇｌｅｎａ ｇｒａｃｉｌｉｓ）細胞抽出物の脂質プロフィールのクロマトグラムを示す。
【図１２】は、様々なミドリムシ（Ｅｕｇｌｅｎａ ｇｒａｃｉｌｉｓ）Δ８デサチュラーゼポリペプチド配列のアラインメントを示す。使用したアラインメントの方法は、「アラインメントのクラスタル（Ｃｌｕｓｔａｌ）Ｖ法」に対応する。
【図１３Ａ】ｐＤＭＷ２７７のプラスミドマップを提供する。
【図１３Ｂ】ｐＺＦ５Ｔ－ＰＰＣのプラスミドマップを提供する。
【図１３Ｃ】ｐＤＭＷ２８７Ｆのプラスミドマップを提供する。
【図１３Ｄ】ｐＤＭＷ２９７のプラスミドマップを提供する。
【図１４Ａ】ｐＺＰ２Ｃ１６Ｍ８９９のプラスミドマップを提供する。
【図１４Ｂ】ｐＤＭＷ３１４のプラスミドマップを提供する。
【図１４Ｃ】ｐＤＭ３２５のプラスミドマップを提供する。
【図１４Ｄ】ｐＺＫＬ５５９８のプラスミドマップを提供する。
【図１５Ａ】ｐＹ７２［または「ｐＹ７２．２ｌｏｘｐ．Ｈｙｇ．Ｆｂａ．Ｆ１５」］のプラスミドマップを提供する。
【図１５Ｂ】ｐＹ８０［または「ｐＹ８０．ｌｏｘｐ．２Ｆ１５」］のプラスミドマップを提供する。
【図１５Ｃ】ｐＹ７９［または「ｐＹ７９．Ｃｒｅ．ＡＨＡＳｗ４９７Ｌ」］のプラスミドマップを提供する。
【図１５Ｄ】ｐＹ８６［または「ｐＹ８６．ｌｏｘｐ．Ｕｒａ３．Ｈｙｇ．Ｆ１２」］のプラスミドマップを提供する。
【図１６Ａ】ｐＹ９４［または「ｐＹ９４．ｌｏｘｐ．Ｄ９ＥＤ８．Ｕｒａ３」］のプラスミドマップを提供する。
【図１６Ｂ】ｐＹ９１Ｍ［または「ｐＹ９１．Ｄｒ．Ｄ６Ｍ（天然）」］のプラスミドマ

ップを提供する。
【図１６Ｃ】ｐＤＭＷ２３２のプラスミドマップを提供する。
【図１６Ｄ】ｐＹ３７／Ｆ１５のプラスミドマップを提供する。
【図１７Ａ】ｐＫＯ２ＵＦ２ＰＥのプラスミドマップを提供する。
【図１７Ｂ】ｐＺＫＵＧＰＩ５Ｓのプラスミドマップを提供する。
【図１７Ｃ】ｐＤＭＷ３０２Ｔ１６のプラスミドマップを提供する。
【図１７Ｄ】ｐＫＯ２ＵＭ２６Ｅのプラスミドマップを提供する。
【図１８Ａ】ｐＺＵＦ－Ｍｏｄ－１のプラスミドマップを提供する。
【図１８Ｂ】ｐＭＤＡＧＡＴ１－１７のプラスミドマップを提供する。
【図１８Ｃ】ｐＭＧＰＡＴ－１７のプラスミドマップを提供する。
【図１９】それぞれモルティエラ・アルピナ（Ｍｏｒｔｉｅｒｅｌｌａ　ａｌｐｉｎａ）中のグリセロール－３－リン酸－ｏ－アシルトランスフェラーゼ（ＧＰＡＴ）に関与する、配列番号１３８、１４０、１４１、１４２、１４３、１４４、１４５、１４６、１４７、および１４８の間の関係を図表を用いて表す。
【図２０】それぞれモルティエラ・アルピナ（Ｍｏｒｔｉｅｒｅｌｌａ　ａｌｐｉｎａ）中のＣ$_{16/18}$脂肪酸エロンガーゼ酵素（ＥＬＯ３）に関わる、配列番号８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、および９３の間の関係を図表を用いて表す。
【図２１Ａ】ｐＺＵＦ６Ｓのプラスミドマップを提供する。
【図２１Ｂ】ｐＺＵＦ６Ｓ－Ｅ３ＷＴのプラスミドマップを提供する。
【図２１Ｃ】ｐＺＫＵＧＰＹＥ１－Ｎのプラスミドマップを提供する。
【図２１Ｄ】ｐＺＫＵＧＰＹＥ２のプラスミドマップを提供する。
【図２２Ａ】ｐＺＫＵＧＰＹＥ１のプラスミドマップを提供する。
【図２２Ｂ】ｐＺＵＦ６ＦＹＥ１のプラスミドマップを提供する。
【図２２Ｃ】ｐＺＰ２ｌ７＋Ｕｒａのプラスミドマップを提供する。
【図２２Ｄ】ｐＹ２０のプラスミドマップを提供する。
【図２２Ｅ】ｐＬＶ１３のプラスミドマップを提供する。

【図１】

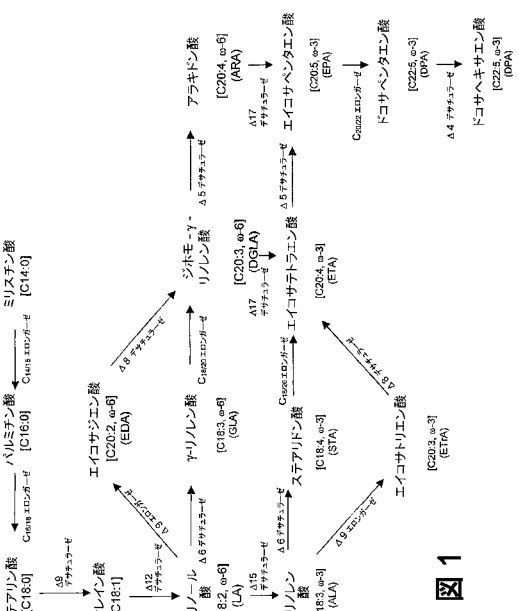


図１

【図２】

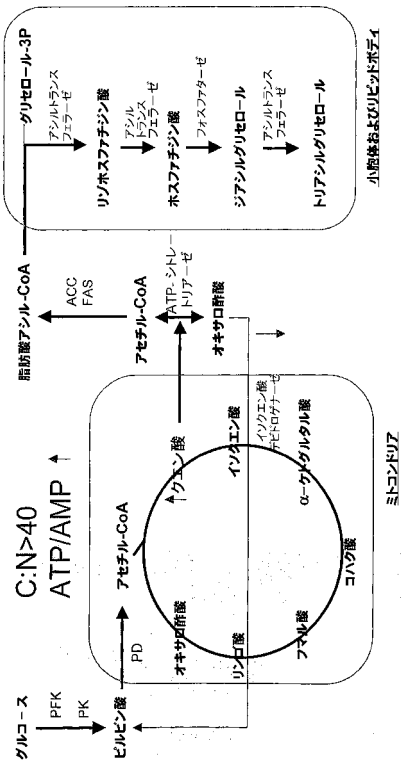


図２

【図３Ａ】

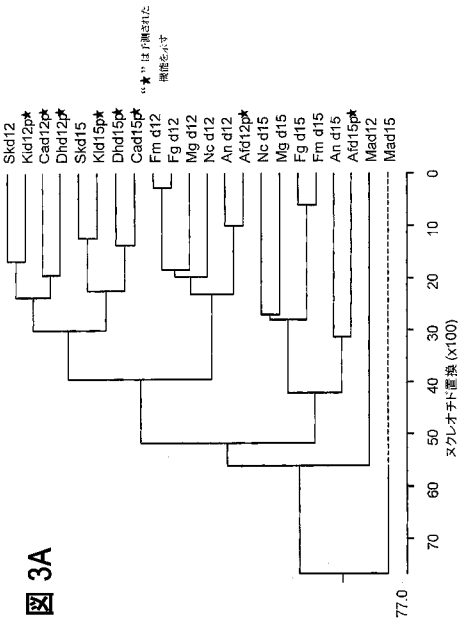


図３Ａ

【図３Ｂ】

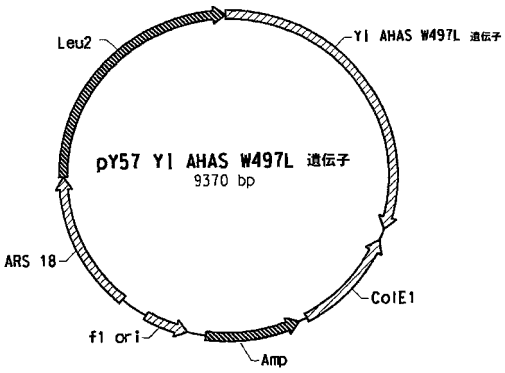


図３Ｂ

【図４Ａ】

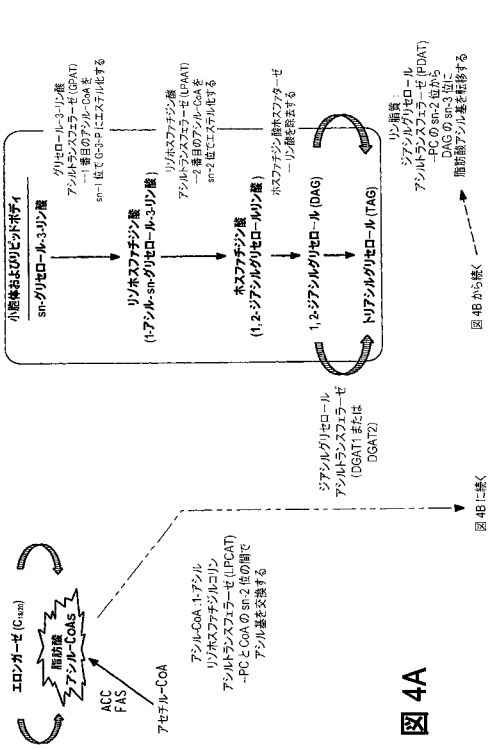


図 4A

【図４Ｂ】

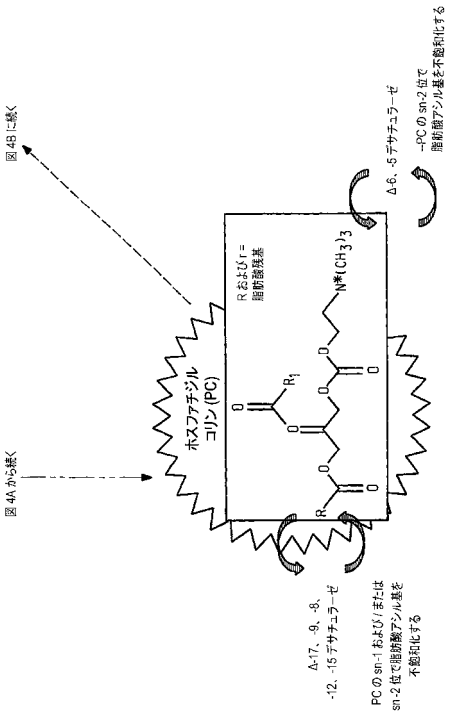


図 4B

【図５Ａ】

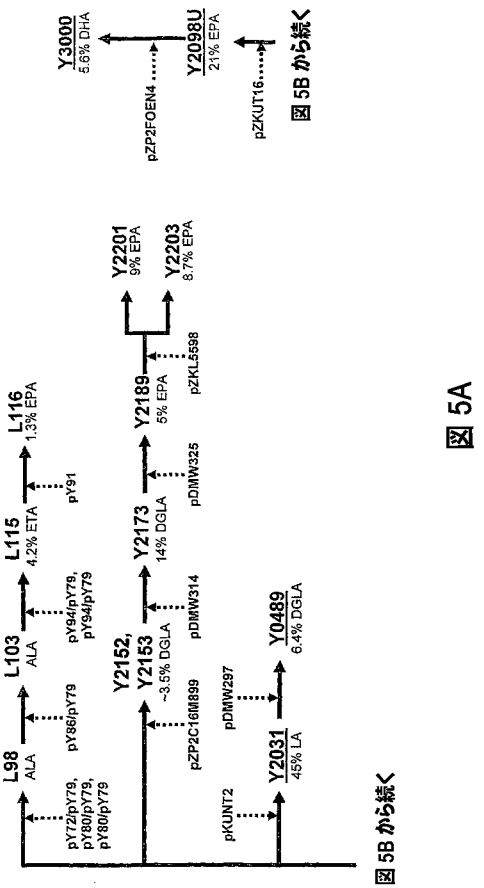


図 5A

【図５Ｂ】

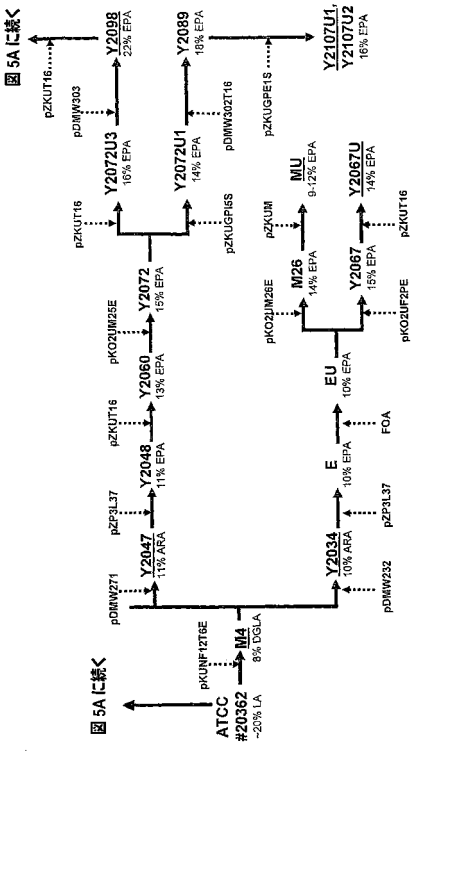


図 5B

【図６Ａ】

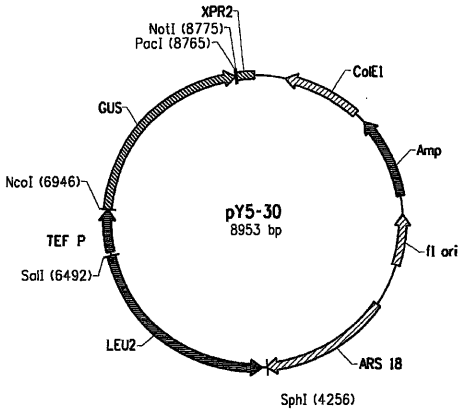


FIG. 6A

【図６Ｂ】

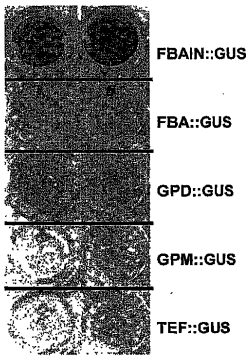


FIG. 6B

【図６Ｃ】

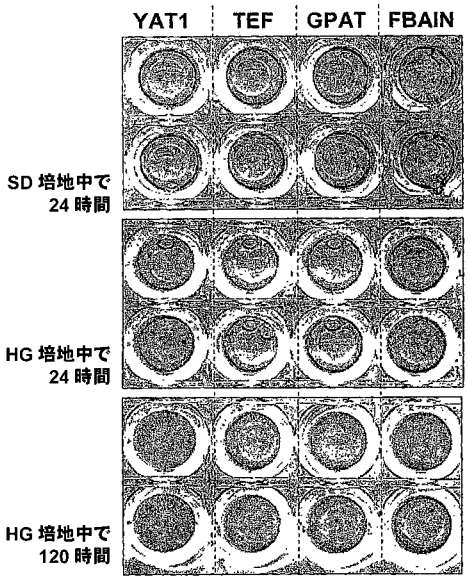


図 6C

【図７Ａ】

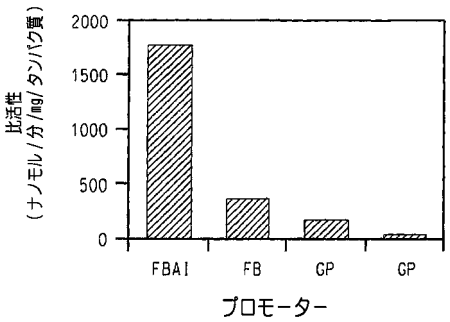


図 7A

【図７Ｂ】

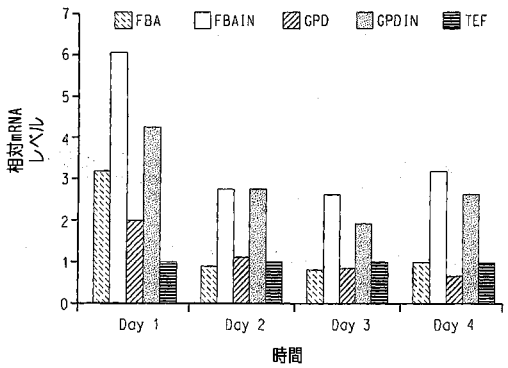


図 7B

【図８Ａ】

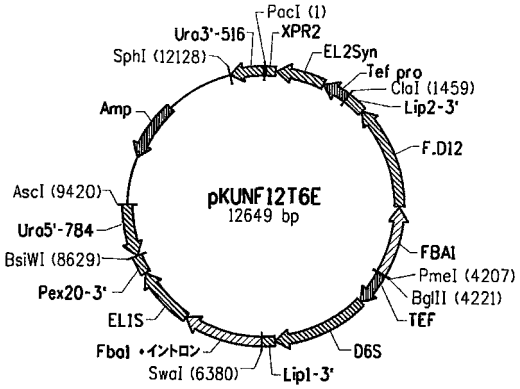


図 8A

【図８Ｂ】

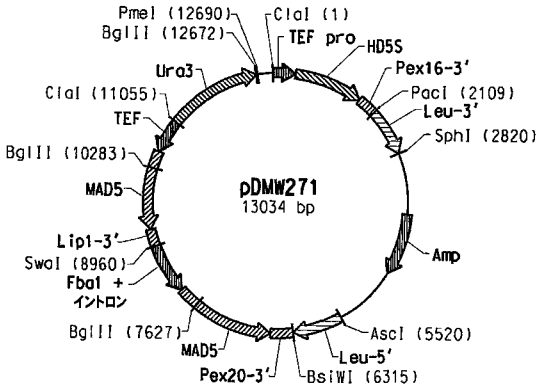


図 8B

【図８Ｃ】

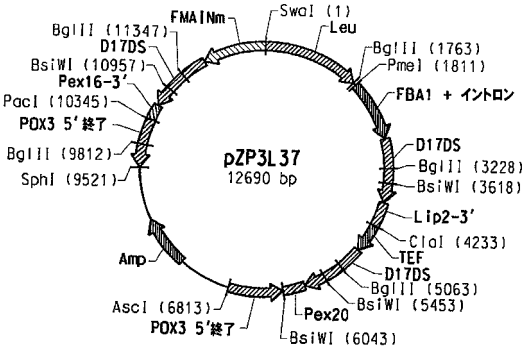


図 8C

【図８Ｄ】

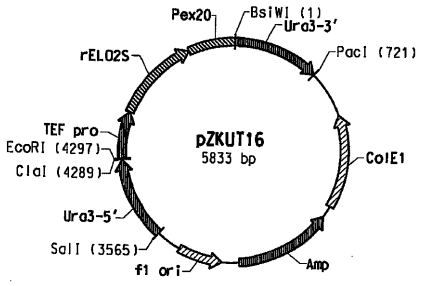


FIG. 8D

【図８Ｅ】

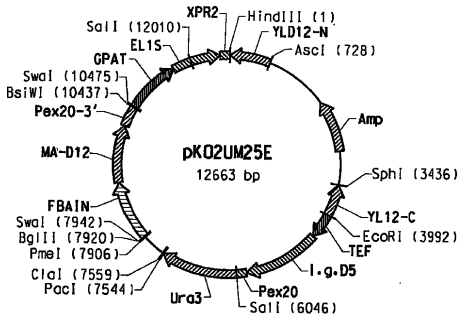


FIG. 8E

【図９Ａ】

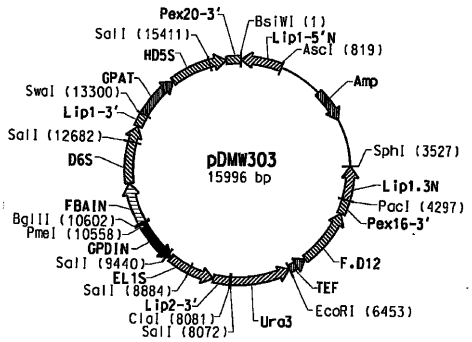


FIG. 9A

【図９Ｂ】

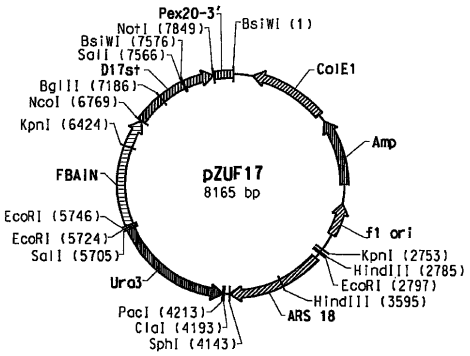


FIG. 9B

【図９Ｃ】

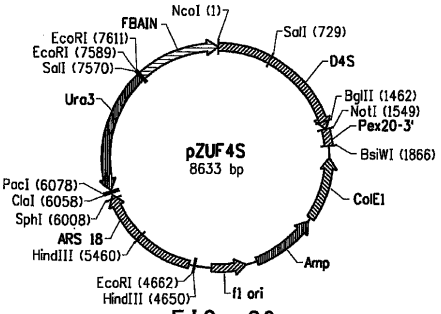


FIG. 9C

【図９Ｄ】

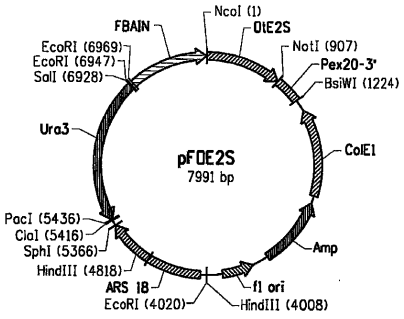


FIG. 9D

【図９Ｅ】

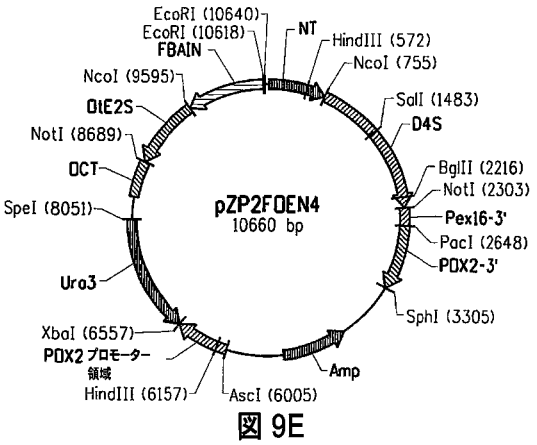


図 9E

【図１０Ａ】

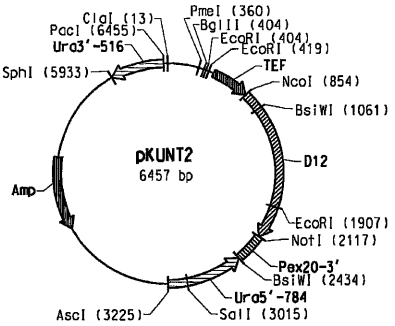


FIG. 10A

【図１０Ｂ】

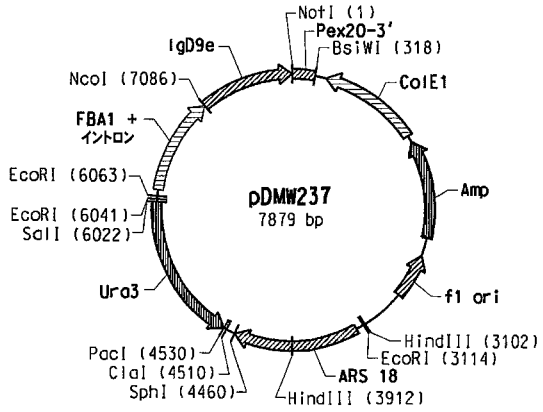


図10B

【図１０Ｃ】

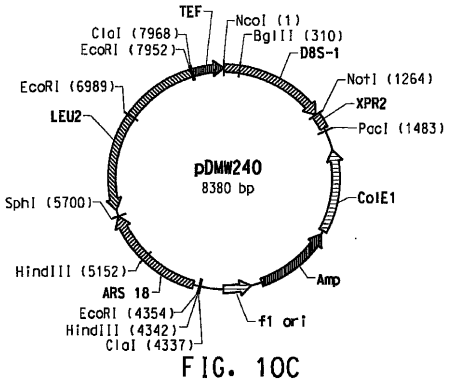


FIG. 10C

【図１０Ｄ】

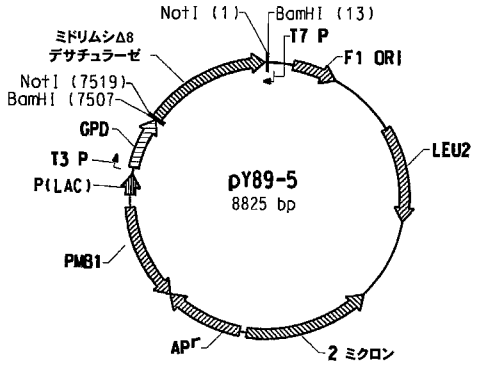


図 10D

【図１０Ｅ】

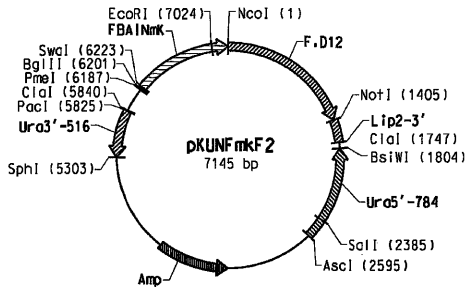


FIG. 10E

【図１１】

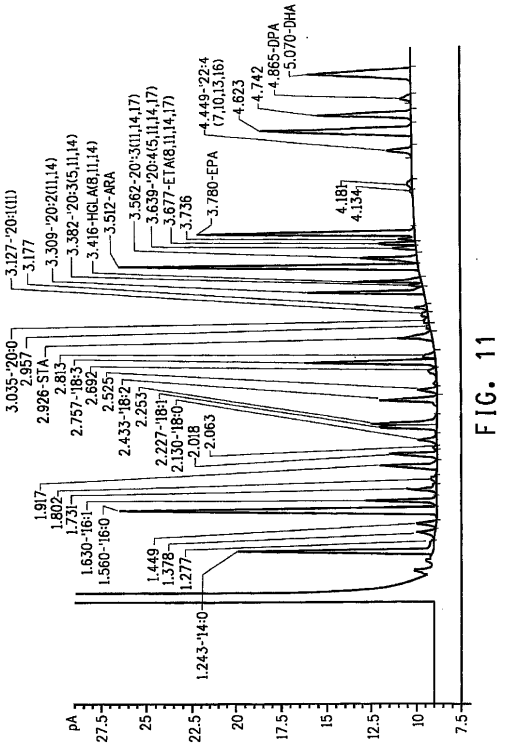


FIG. 11

【図１２】

```
                ******** **     ****  *************************** *********
配列番号:78 MKSKRQAL-PLTIDGTTYDVSAWVNFHPGGAEIIENYQGRDATDAFMVMHSQEAFDKLKR
配列番号:80 MKSKRQAL-PLTIDGTTYDVSAWVNFHPGGAEIIENYQGRDATDAFMVMHSQEAFDKLKR
配列番号:73 MKSKRQALSPLQLMEQTYDV---VNFHPGGAEIIENYQGRDATDAFMVMHFQEAFDKLKR
配列番号:74 MKSKRQALSPLQLMEQTYDVSAWVNFHPGGAEIIENYQGRDATDAFMVMHFQEAFDKLKR

                ******* ************************************************
配列番号:78 MPKINPSSELPPQAAVNEAQEDFRKLREELIATGMFDASPLWYSYKISTTLGLGVLGYFL
配列番号:80 MPKINPSSELPPQAAVNEAQEDFRKLREELIATGMFDASPLWYSYKISTTLGLGVLGYFL
配列番号:73 MPKINPSFELPPQAAVNEAQEDFRKLREELIATGMFDASPLWYSYKISTTLGLGVLGYFL
配列番号:74 MPKINPSFELPPQAAVNEAQEDFRKLREELIATGMFDASPLWYSYKISTTLGLGVLGYFL

                ********************************************************** **
配列番号:78 MVQYQMYFIGAVLLGMHYQQMGWLSHDICHHQTFKNRNWNNLVGLVFGNGLQGFSVTWWK
配列番号:80 MVQYQMYFIGAVLLGMHYQQMGWLSHDICHHQTFKNRNWNNLVGLVFGNGLQGFSVTWWK
配列番号:73 MVQYQMYFIGAVLLGMHYQQMGWLSHDICHHQTFKNRNWNNLVGLVFGNGLQGFSVTCWK
配列番号:74 MVQYQMYFIGAVLLGMHYQQMGWLSHDICHHQTFKNRNWNNLVGLVFGNGLQGFSVTCWK

                ********************** ***********************************
配列番号:78 DRHNAHHSATNVQGHDPDIDNLPLLAWSEDDVTRASPISRKLIQFQQYYFLVICILLRFI
配列番号:80 DRHNAHHSATNVQGHDPDIDNLPLLAWSEDDVTRASPISRKLIQFQQYYFLVICILLRFI
配列番号:73 DRHNAHHSATNVQGHDPDIDNLPPLAWSEDDVTRASPISRKLIQFQQYYFLVICILLRFI
配列番号:74 DRHNAHHSATNVQGHDPDIDNLPPLAWSEDDVTRASPISRKLIQFQQYYFLVICILLRFI

                ************************************* ********************
配列番号:78 WCFQSVLTVRSLKDRDNQFYRSQYKKEAIGLALHWTLKTLFHLFFMPSILTSLLVFFVSE
配列番号:80 WCFQSVLTVRSLKDRDNQFYRSQYKKEAIGLALHWTLKALFHLFFMPSILTSLLVFFVSE
配列番号:73 WCFQCVLTVRSLKDRDNQFYRSQYKKEAIGLALHWTLKALFHLFFMPSILTSLLVFFVSE
配列番号:74 WCFQCVLTVRSLKDRDNQFYRSQYKKEAIGLALHWTLKALFHLFFMPSILTSLLVFFVSE

                ********************** ***********************************
配列番号:78 LVGGFGIAIVVFMNHYPLEKIGDSVWDGHGFSVGQIHETMNIRRGIITDWFFGGLNYQIE
配列番号:80 LVGGFGIAIVVFMNHYPLEKIGDSVWDGHGFSVGQIHETMNIRRGIITDWFFGGLNYQIE
配列番号:73 LVGGFGIAIVVFMNHYPLEKIGDPVWDGHGFSVGQIHETMNIRRGIITDWFFGGLNYQIE
配列番号:74 LVGGFGIAIVVFMNHYPLEKIGDPVWDGHGFSVGQIHETMNIRRGIITDWFFGGLNYQIE

                ************************************************************
配列番号:78 HHLWPTLPRHNLTAVSYQVEQLCQKHNLPYRNPLPHEGLVILLRYLAVFARMAEKQPAGK
配列番号:80 HHLWPTLPRHNLTAVSYQVEQLCQKHNLPYRNPLPHEGLVILLRYLAVFARMAEKQPAGK
配列番号:73 HHLWPTLPRHNLTAVSYQVEQLCQKHNLPYRNPLPHEGLVILLRYLAVFARMAEKQPAGK
配列番号:74 HHLWPTLPRHNLTAVSYQVEQLCQKHNLPYRNPLPHEGLVILLRYLAVFARMAEKQPAGK

                *
配列番号:78 AL.
配列番号:80 AL.
配列番号:73 A-L
配列番号:74 A-L
```

図 12

【図１３Ａ】

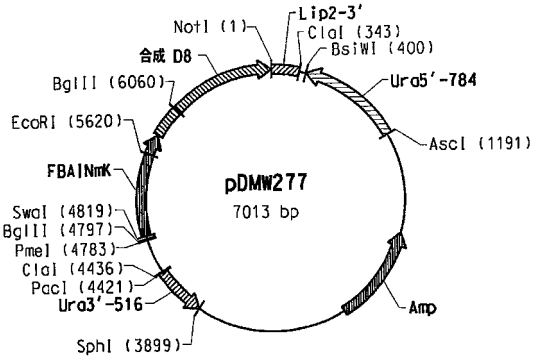


図 13A

【図１３Ｂ】

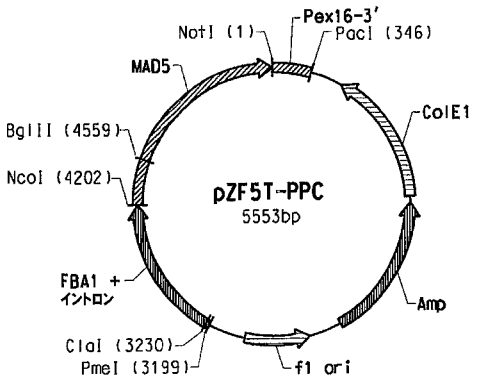


図 13B

【図１３Ｃ】

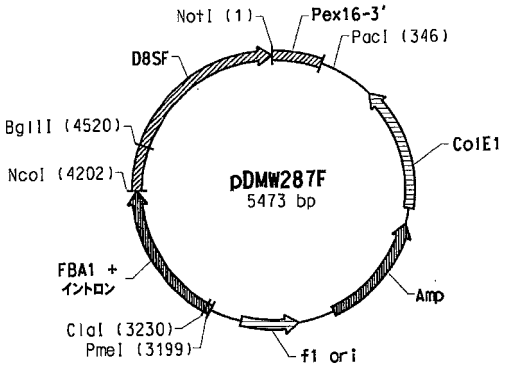


図 13C

【図１３Ｄ】

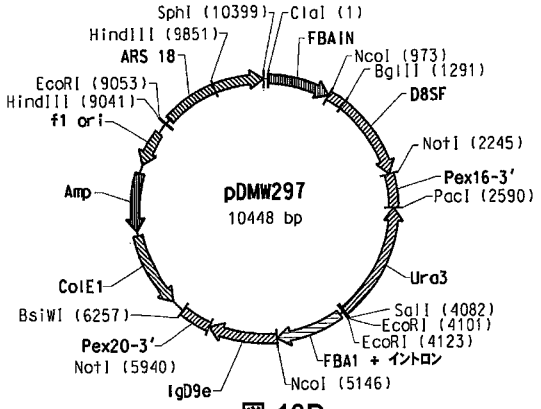


図 13D

【図１４Ａ】

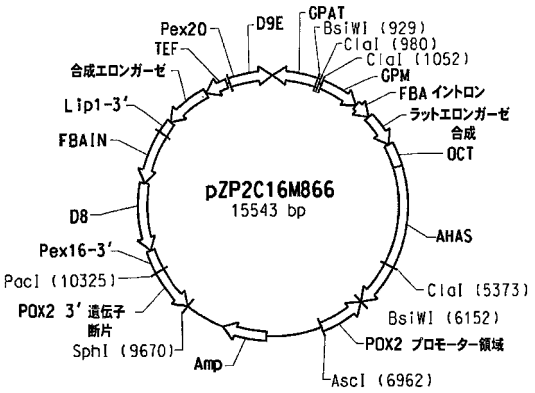


図 14A

【図１４Ｂ】

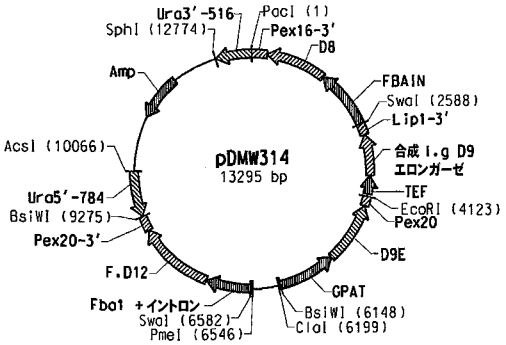


図 14B

【図１４Ｃ】

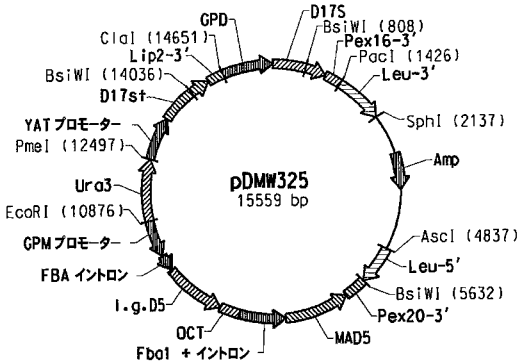


図 14C

【図１４Ｄ】

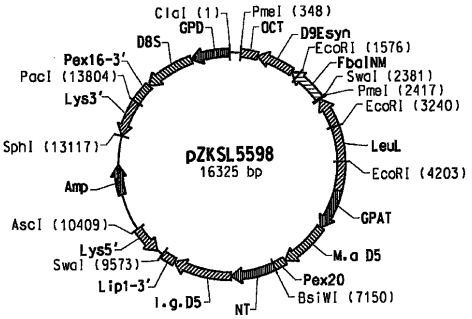


FIG. 14D

【図１５Ａ】

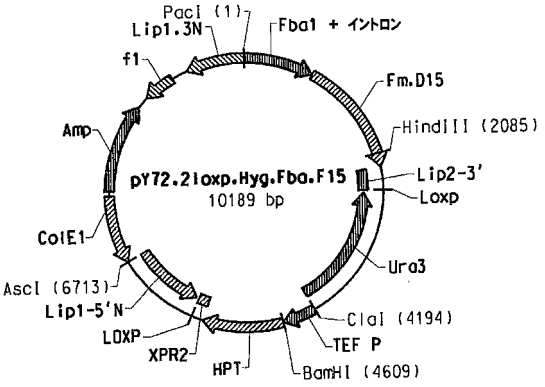


図 15A

【図１５Ｂ】

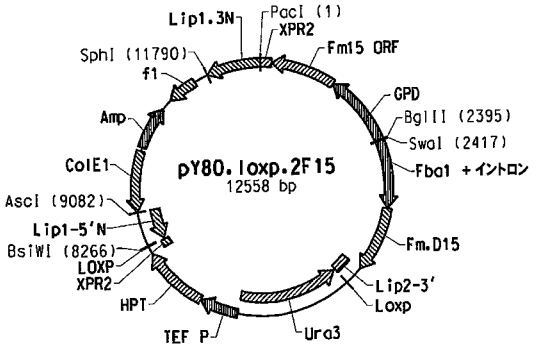


図 15B

【図１５Ｃ】

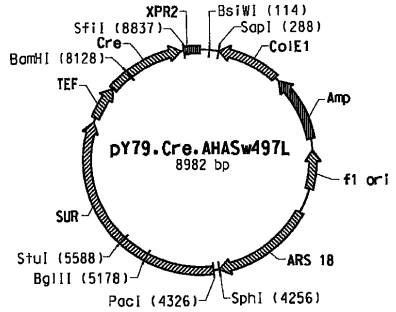


FIG. 15C

【図１５Ｄ】

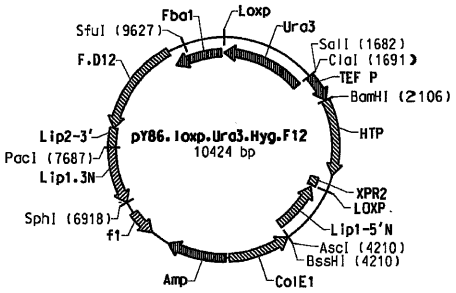


FIG. 15D

【図１６Ａ】

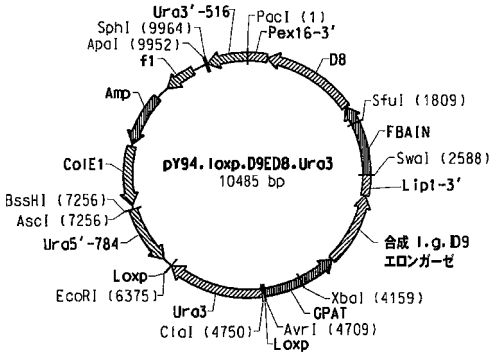


図 16A

【図１６Ｂ】

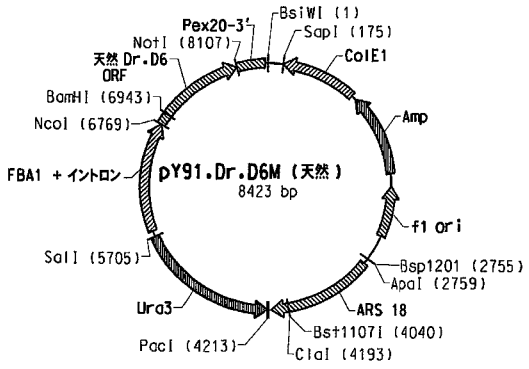


図 16B

【図１６Ｃ】

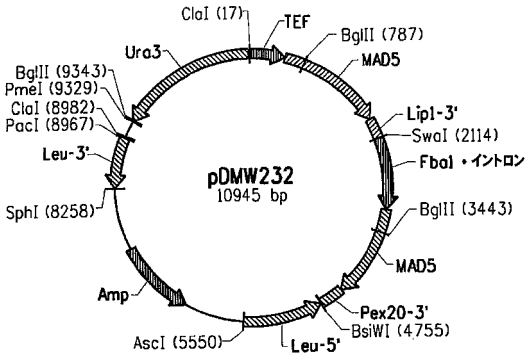


図 16C

【図１６Ｄ】

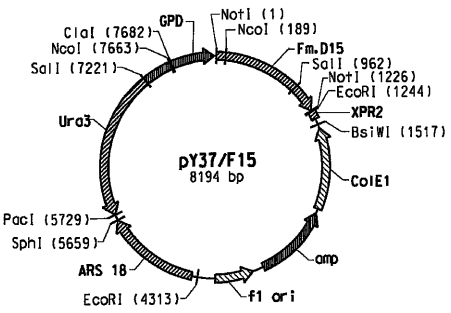


FIG. 16D

【図１７Ａ】

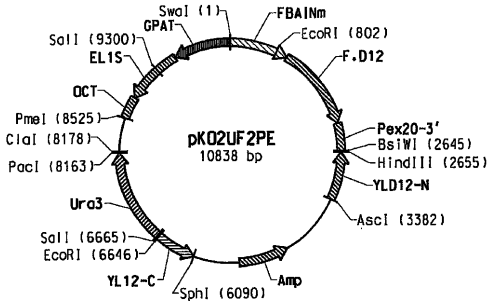


FIG. 17A

【図１７Ｂ】

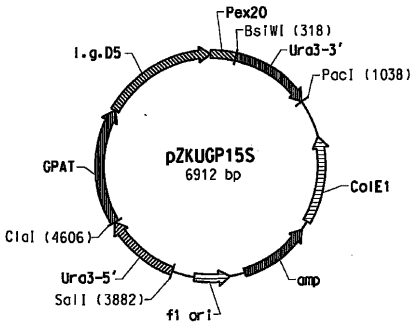


FIG. 17B

【図１７Ｃ】

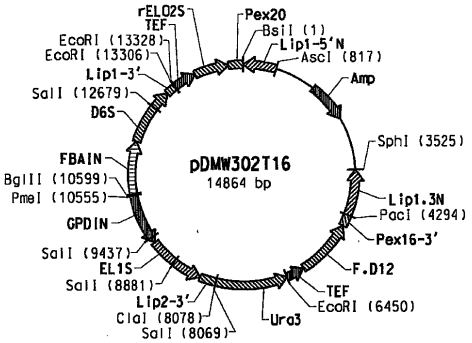


FIG. 17C

【図１７Ｄ】

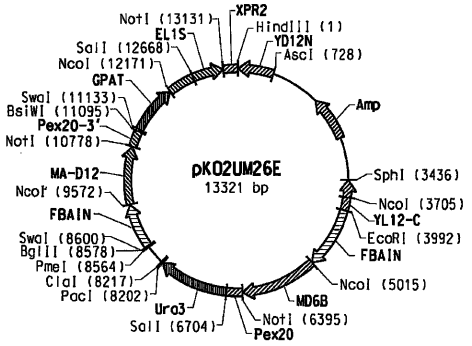


FIG. 17D

【図１８Ａ】

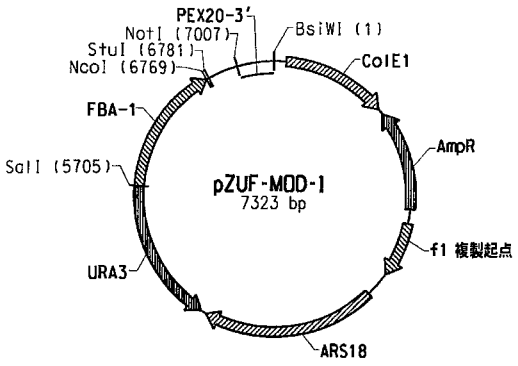


図 18A

【図１８Ｂ】

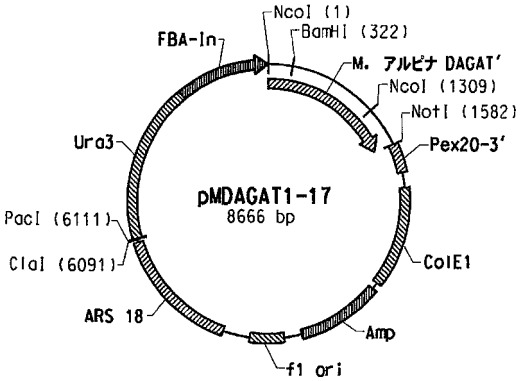


図 18B

【図１８Ｃ】

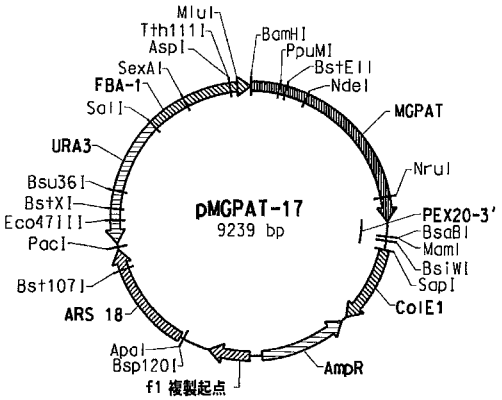


図 18C

【図１９】

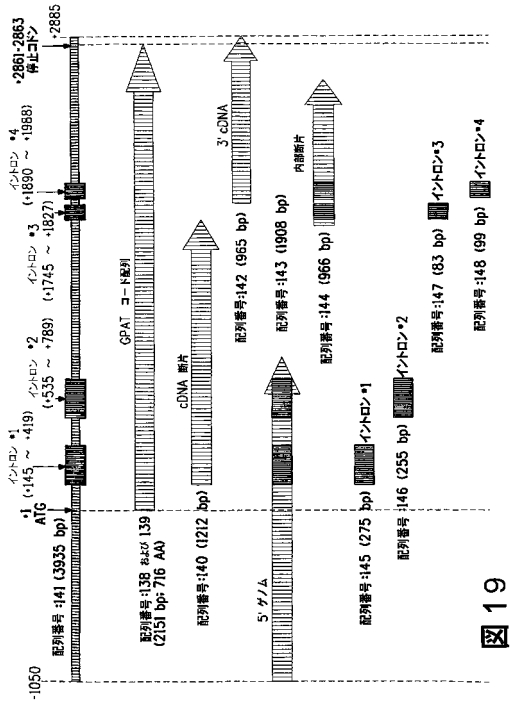


図 19

【図２０】

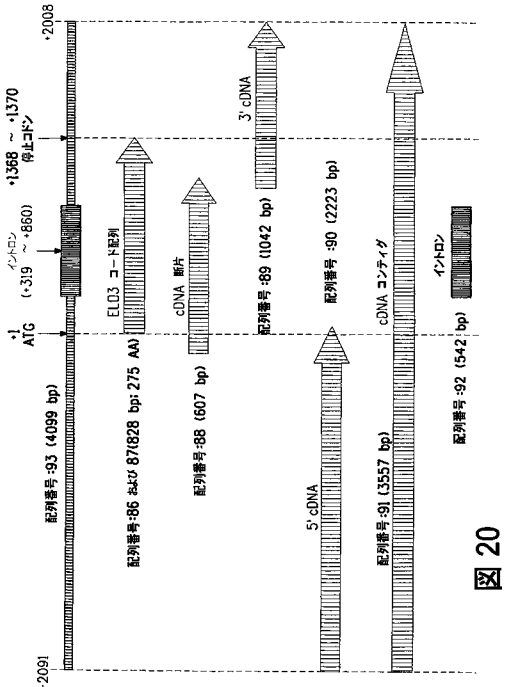


図 20

【図２１Ａ】

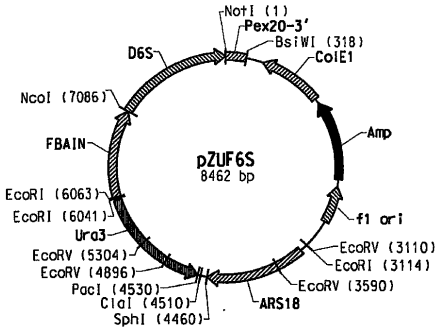


FIG. 21A

【図２１Ｂ】

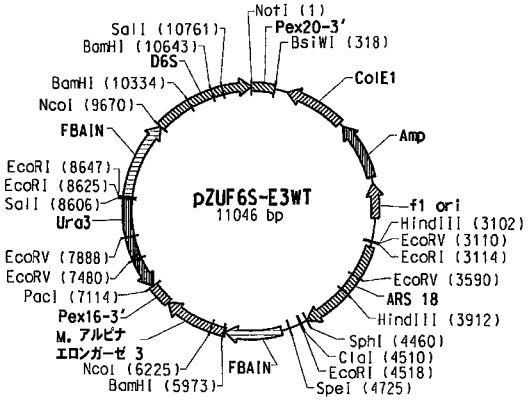


図 21B

【図２１Ｃ】

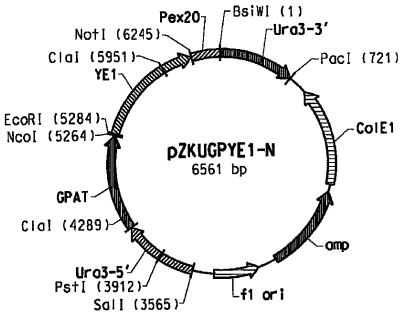


FIG. 21C

【図２２Ｂ】

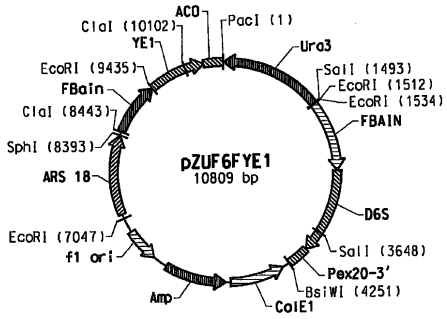


FIG. 22B

【図２２Ｃ】

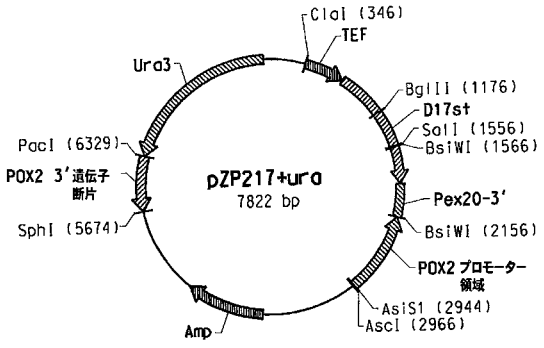


図 22C

【図２１Ｄ】

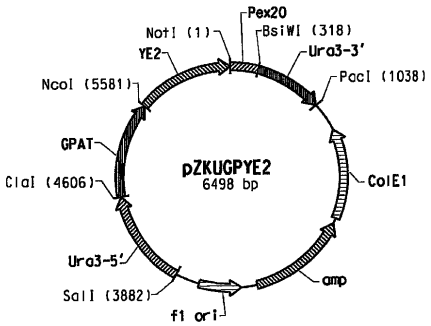


FIG. 21D

【図２２Ａ】

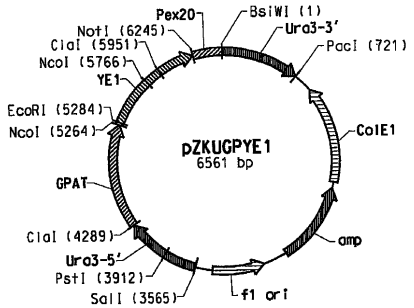


FIG. 22A

【図２２Ｄ】

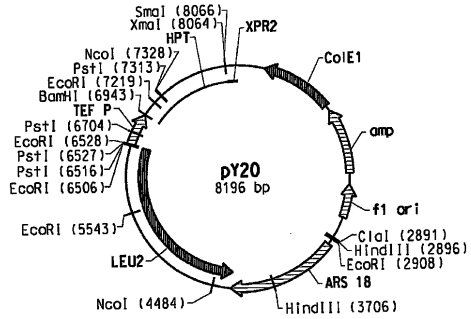


FIG. 22D

【図２２Ｅ】

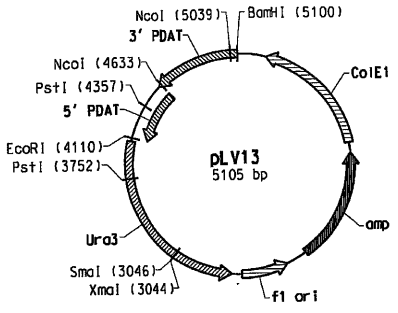


FIG. 22E

【配列表】
2008520193000001.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
A23L	***1/30***	***(2006.01)***	Ａ２３Ｌ	1/30	Ｚ	４Ｂ０２６
C12N	***15/09***	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｎ	15/00	Ａ	４Ｂ０６４
A23D	***9/007***	***(2006.01)***	Ａ２３Ｄ	9/00	５１６	４Ｂ０６５
A23C	***9/152***	***(2006.01)***	Ａ２３Ｃ	9/152		４Ｃ０８７
C11C	***3/00***	***(2006.01)***	Ｃ１１Ｃ	3/00		４Ｃ２０６
A61K	***31/202***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	31/202		４Ｈ０５９
A23K	***1/16***	***(2006.01)***	Ａ２３Ｋ	1/16	３０４Ｂ	
A23K	***1/18***	***(2006.01)***	Ａ２３Ｋ	1/16	３０１Ｆ	
A61K	*36/06*	*(2006.01)*	Ａ２３Ｋ	1/18	Ａ	
A61P	*25/28*	*(2006.01)*	Ａ２３Ｋ	1/18	１０２Ｂ	
A61P	*25/32*	*(2006.01)*	Ａ２３Ｋ	1/18	１０２Ａ	
A61P	*25/24*	*(2006.01)*	Ａ２３Ｋ	1/18	Ｄ	
A61P	*25/20*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	35/72		
A61P	*3/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/28		
A61P	*11/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/32		
			Ａ６１Ｐ	25/24		
			Ａ６１Ｐ	25/20		
			Ａ６１Ｐ	3/00		
			Ａ６１Ｐ	11/00		

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ギリーズ，ピーター・ジヨン
アメリカ合衆国ペンシルベニア州１９３５０ランデナーグ・ポートロイヤルコート５０１
(72)発明者 マクール，ダニエル・ジヨセフ
アメリカ合衆国ペンシルベニア州１９１３０フイラデルフイア・メレデイスストリート２５２５
(72)発明者 ピカタジオ，スチーブン・ケイ
アメリカ合衆国ペンシルベニア州１９３５０ランデンバーグ・メドーウツドレーン１７
(72)発明者 ラギアンテイ，ジエイムズ・ジヨン
アメリカ合衆国デラウエア州１９７０１ベア・デサイデドリーレーン１５
(72)発明者 スー，ツイシオング
アメリカ合衆国ペンシルベニア州１９３１７－９７２８チヤズフオード・ハーベイレーン１１１
(72)発明者 ヤダブ，ナレンドラ・エス
アメリカ合衆国ペンシルベニア州１９３１７チヤズフオード・ノルレーン３７０４
(72)発明者 ツアング，ホンシアング
アメリカ合衆国ペンシルベニア州１９３１７チヤズフオード・ロサーフイールドレーン３８０８
(72)発明者 ズー，クイン・クン
アメリカ合衆国ペンシルベニア州１９３８２ウエストチエスター・リベアロード５４４
(72)発明者 セイプ，ジヨン・イー
アメリカ合衆国ニユージヤージイ州０８００１アロウエイ・ポストオフイスボツクス１２９

Ｆターム(参考) 2B005 AA05 BA01 BA05 DA01 DA05 GA01 GA02 GA06 MB02
2B150 AA02 AA05 AA06 AA07 AC24 DA37 DD12 DD21 DD26

4B001 AC15 BC01 EC05
4B018 LB06 LB07 LB10 MD11 MD81 ME02 MF01 MF13
4B024 AA01 AA05 AA10 BA07 BA80 CA01 DA01 DA02 DA05 DA11
DA12 EA04 FA02 GA11 HA08
4B026 DC05 DG20 DX01
4B064 AD12 CA06 CA19 CC24 DA01 DA10 DA11
4B065 AA01X AA57X AA72X AA72Y AA87X AB01 BA02 CA10 CA13 CA41
CA43 CA44
4C087 AA01 AA02 BC11 MA52 NA14 ZA05 ZA12 ZA15 ZA59 ZC21
ZC39
4C206 AA01 AA02 DA05 KA19 MA01 MA04 NA14 ZA05 ZA12 ZA15
ZA59 ZC21 ZC39
4H059 BB05 BB07 BC48